

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-155595

(43)Date of publication of application : 15.06.1999

(51)Int.Cl.

C12Q 1/32

C12Q 1/26

C12Q 1/60

G01N 33/92

(21)Application number : 09-325023

(71)Applicant : INTERNATL REAGENTS CORP

(22)Date of filing : 26.11.1997

(72)Inventor : KISHI KOJI

SUMIYAMA ISAO

SHIRAHASE YASUSHI

TOTSU YOSHIFUMI

## (54) DETERMINATION OF LIPOPROTEIN CHOLESTEROL AND REAGENT KIT

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide both a method for determining the cholesterol in a fraction of a lipoprotein such as a high-density lipoprotein(HDL) or a low-density lipoprotein (LDL) in a biological sample without carrying out the separation by centrifuging operating using a general-purpose automatic analyzer and without causing turbidity during the reaction and a reagent kit suitable used for the method.

**SOLUTION:** Cholesterol in another lipoprotein fraction is reacted with at least a cholesterol oxidase to determine the absorbance. Cholesterol in a specific lipoprotein fraction is then reacted with at least a cholesterol dehydrogenase to determine the absorbance. The cholesterol concentration in the specific lipoprotein fraction is determined from the difference in the absorbance. The operations are especially performed under conditions without causing the turbidity in the reactional liquid. Thereby, the cholesterol in the specific lipoprotein fraction can be determined. Since separating fractionation such as centrifuging fractionation is not required, the operations are simple and problems in determination errors and artificial factors can be reduced. The continuous determination using a general-purpose type automatic analyzer can be performed and the determination of the cholesterol can be multichanneled with other test items to carry out the determination.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

16.05.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**


---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol characterized by making the cholesterol in a specific lipoprotein fraction act on a cholesterol dehydrogenase at least, measuring an absorbance, and carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction from the difference of both absorbances after being the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in a biological material under coexistence of other lipoprotein fractions, making the cholesterol in other lipoprotein fractions act on a cholesterol oxidase at least and measuring an absorbance.

[Claim 2] The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol characterized by being the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in a biological material under coexistence of other lipoprotein fractions, and making the compound which can form the complex of lipoprotein cholesterol and water fusibility in reaction time with a biological material, a cholesterol oxidase, and a cholesterol dehydrogenase at least exist, and making it not make the reaction time concerned produce an aggregate.

[Claim 3] The fixed quantity method of lipoprotein cholesterol and the lipoprotein cholesterol according to claim 2 as which the compound which can form the complex of water fusibility is chosen from KARIKUSU allenes, a KARIKUSU allene derivative, the poly anion, water-soluble polymer, and polysaccharide and which is a kind at least.

[Claim 4] Under the conditions which it is [ conditions ] the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in a biological material under coexistence of other lipoprotein fractions, and do not produce condensation of the lipoprotein in a biological material The cholesterol in other lipoprotein fractions is made to act on a cholesterol oxidase at least. The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol characterized by making the cholesterol in a specific lipoprotein fraction act on a cholesterol dehydrogenase at least, measuring an absorbance, and carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction from the difference of both absorbances after measuring an absorbance.

[Claim 5] The fixed quantity method of lipoprotein cholesterol according to claim 1 to 4 that a specific lipoprotein is the quality of high density lipoprotein, the quality of low-density lipoprotein, the quality of very low density lipoprotein, or a remnant Mr. lipoprotein.

[Claim 6] The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol according to claim 1 to 5 which is the enzyme with which a cholesterol dehydrogenase carries out the catalyst of the reaction which changes beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type, a Thio-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type, beta-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidation type, or a Thio-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidation type into these reduction types.

[Claim 7] The reagent kit for lipoprotein cholesterol measurement which is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase, and is a reagent kit for carrying out a fixed quantity under coexistence of other lipoprotein fractions, and makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a component at least.

[Claim 8] The reagent kit for lipoprotein cholesterol measurement which is a reagent kit for

measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase, and is a reagent kit for carrying out a fixed quantity under coexistence of other lipoprotein fractions, and makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a component at least, without making the lipoprotein in a biological material condense.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention relates to the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol which is among the lipoprotein fraction in a biological material, and the reagent kit used suitable for this method in the field of a clinical diagnosis

[0002]

[Description of the Prior Art] Fractionation of the lipoprotein is carried out to the quality of high density lipoprotein (HDL, specific gravity 1.063–1.21), the quality of low-density lipoprotein (LDL, specific gravity 1.019–1.063), the quality of very low density lipoprotein (VLDL, specific gravity 1.006–1.019), and the Cairo micron (CM, specific gravity <1.006) by ultracentrifuge operation for many years. This fractionation operation needed the ultracentrifuge upwards, and centrifugal had to be performed for several days and was not able to process many samples. this — instead of — fractionation which made bivalent cations, such as magnesium and calcium, live together in the poly anion, or made the bivalent cation live together in a tungstophosphoric acid, such as a polyethylene glycol or dextran sulfate, — an agent — the method of carrying out fractionation only of the HDL which it is made to mix with a solution and a blood serum, and LDL, VLDL, and CM are settled, and remains in the supernatant liquid after centrifugal was in use The automatic analyzer which has spread widely in the field of a clinical test was able to be used for this method. That is, since measurement of the total cholesterol by enzymatic process was established with the automatic analysis machine, the cholesterol in the HDL fraction which carried out fractionation was able to apply it, and was able to ask for the cholesterol concentration in a HDL fraction.

[0003] however, the fixed quantity error at the time of making it mix with a fractionation agent and a blood serum with it and a sample — mistaking — etc. — it had become a problem [ this method also needs centrifugal operation and artificial although it is a low speed ] Moreover, it has not measured simultaneously with other general biochemistry items with an automatic analyzer. Quick correspondence is called for and, as for the clinical test, shortening of inspection time had become a technical problem also from this thing.

[0004] There is a report [the reference value of the total cholesterol, a setting basis, arteriosclerosis, 24 (6), 260 (1996)] which, on the other hand, thinks as important the cholesterol value in the LDL fraction which is the risk-factor of arteriosclerosis clinically. The cholesterol value in a present LDL fraction substitutes and searches for an experiential factor from the measurement result of the cholesterol in the total cholesterol (T-CHO), a neutral fat (TG), and a HDL fraction. The formula [Friedewald WT, et al, Clin.Chem., 18,499–502 (1972)] is shown below.

[0005] The cholesterol value in a LDL fraction = (T-CHO value) – (cholesterol value in HDL fraction) – (TG value)/5. [0006] By this method, if all of three items to measure are not measured by accuracy, it is not materialized. moreover, [Warnick GR said for calculated value to stop reflecting the cholesterol concentration in a LDL fraction if TG value exceeds 400 mg/dl or the cholesterol concentration in a LDL fraction becomes 100 or less mg/dl, et al, and Clin.Chem. — 36 (1), 15–19 (1990), McNamara JR, et al, and Clin.Chem. — 36 (1) and 36–42 (1990) — ]. Therefore, it is the method by which important outlying observation is not

calculated. There are the method of separating lipoprotein by electrophoresis and otherwise, measuring the amount of proteins and a measuring method of the cholesterol according to lipoprotein by HPLC, and expensive equipment is [ it is the way a sample throughput is missing, and ] also needed.

[0007] In order to solve the problem mentioned above about the cholesterol measurement in a HDL fraction in recent years, the kit which measures the cholesterol in a full automatic HDL fraction is developed, and it is spreading. Although the technology looked at by the patent No. 2600065 official report, JP,8-201393,A, and JP,8-131195,A uses a fractionation agent together, it forms insoluble settlings with the detergent for which the metal used as a bivalent cation contained in a fractionation agent is generally used with an automatic analyzer, and when it is accumulated by the waste fluid mechanism, it causes failure. Furthermore, the insoluble aggregate was formed into reaction mixture, the muddiness which affects a measurement result arose, the reaction cell was polluted by about [ that it is the cause of a measurement error ], and the aggregate, and the measurement result of other biochemistry items measured simultaneously is affected not a little.

[0008] Almost all diffused automatic analyzers complete a reaction in many cases in 10 minutes. If turbidity change is in a reaction at this time, a problem is in the accuracy of measured value. In addition, if reaction mixture becomes muddy, the problem that repeatability falls will also be added. So, a limit cannot join the sample to measure and it cannot respond to broad measurement wavelength and various patient samples. For example, near 340nm (UV region), there is a fault which an absorbance becomes two to three or more, and often exceeds the tolerance of an analysis machine according to the phenomenon of the muddiness by the aggregate.

[0009] although the technology of JP,9-96637,A which does not use a bivalent cation is the method of including lipoprotein and the antiserum to condense, since it forms the antigen antibody aggregate this [ whose ] is also poorly soluble, a reaction cell is polluted Therefore, the measurement result of other biochemistry items measured simultaneously is affected not a little. Moreover, since the muddiness in reaction mixture serves as intensity, exact measurement is impossible by the same cause as the above-mentioned also to the cholesterol measurement in the HDL fraction especially by UV field. The accuracy of measured value is missing under the influence of muddiness also in a tidal-wave length region.

[0010] moreover, although there is also JP,6-242110,A which is the technology which finally eliminates such muddiness, when it is this method, also at the lowest, reagent distributive-pouring operation of three to 4 stage is needed, and since what is a maximum of 2 stages is in use, it is inapplicable [ the automatic analysis machine for biochemistry items which has generally spread ] in many cases On the other hand, if it results in measurement of the cholesterol in a LDL fraction, it is the situation which also cannot but take the method by calculation now.

[0011] In order that the reagent for measurement used for a clinical test may think the versatility as important, the device of activation of an enzyme etc. is made for maintenance of buffer capacity, stabilization, liquefaction of a reagent, the antiseptis effect, and short-time measurement.

[0012] Addition of the hydrazines aiming at shortening of reaction time is needed for measurement of the cholesterol using a cholesterol dehydrogenase (CDH) (JP,5-176797,A). However, it is since hydrazines are made to exist at the first reaction in this method. Things other than the quality of the specified substance which it made the soluble complex when reaction mixture added the surfactant which reaction mixture is fluctuated to a high ionic strength lower next door and 8.0 neighborhood [ which are the optimum pH of CDH at the second reaction ], i.e., alkalinity, side, or is an activator of a cholesterol dehydrogenase or cholesterol esterase further decompose, and the decomposition product participates in this reaction, and causes dispersion in measured value.

[0013] In the conditions which measure the cholesterol in a HDL fraction, the separated type cholesterol which exists in the front face in a LDL fraction is mentioned as matter which is easy to participate in this reaction. As a method of suppressing these decomposition, it is

possible independent or to suppress the intervention to this reaction for the antibody to things other than the poly anion, divalent-metal ion, a water-soluble-polymer compound, or the quality of the specified substance by adding combining two or more sorts and making an aggregate or an immune complex form.

[0014] However, generation of the muddiness by these aggregates and immune complexes serves as the obstacle that the above-mentioned various problems are also serious, by the ultraviolet-region measuring method (the UV method) in the wavelength of 340nm which used CDH.

[0015]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It inquired wholeheartedly about the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the fraction of lipoproteins, such as HDL in a biological material, and LDL, and the reagent kit used suitable for this method, without producing muddiness in a reaction, without carrying out separation according to centrifugal operation in view of such a situation using a automatic analysis machine with general-purpose this invention persons.

[0016]

[Means for Solving the Problem] After this invention persons made the cholesterol in lipoprotein fractions other than the purpose used as a measurement error react by the cholesterol oxidase and made it decompose in reaction mixture beforehand, they found out the method of measuring the cholesterol in the lipoprotein fraction subsequently made into the purpose using a cholesterol dehydrogenase etc. Furthermore, this invention persons found out that the various judgment fixed quantities of the cholesterol in a lipoprotein fraction were possible, without producing muddiness in reaction mixture by making the compound which can form the complex of lipoprotein cholesterol, such as KARIKUSU allenes and a derivative of those, the poly anion, water-soluble polymer, and polysaccharide, and water fusibility in reaction time with a biological material, a cholesterol oxidase, and a cholesterol dehydrogenase exist (namely, thing to add).

[0017] Namely, this invention is the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in \*\* biological material under coexistence of other lipoprotein fractions. The cholesterol in other lipoprotein fractions is made to act on a cholesterol oxidase at least. After measuring an absorbance, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol dehydrogenase at least. The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol characterized by measuring an absorbance and carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction from the difference of both absorbances, \*\* It is the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in a biological material under coexistence of other lipoprotein fractions. The compound which can form the complex of lipoprotein cholesterol and water fusibility in reaction time with a biological material, a cholesterol oxidase, and a cholesterol dehydrogenase at least is made to exist. And the fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol characterized by making it not make the reaction time concerned produce an aggregate, \*\* The compound which can form the complex of lipoprotein cholesterol and water fusibility The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol given [ which is chosen from KARIKUSU allenes, a KARIKUSU allene derivative, the poly anion, water-soluble polymer, and polysaccharide / above-mentioned ] in \*\* which is a kind at least, \*\* Under the conditions which it is [ conditions ] the method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in a biological material under coexistence of other lipoprotein fractions, and do not produce condensation of the lipoprotein in a biological material The cholesterol in other lipoprotein fractions is made to act on a cholesterol oxidase at least. After measuring an absorbance, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol dehydrogenase at least. The fixed quantity method of the lipoprotein cholesterol characterized by measuring an absorbance and carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction from the difference of both absorbances, \*\* The fixed quantity method of lipoprotein cholesterol given in either the above-mentioned \*\* whose specific lipoprotein is the quality of high density lipoprotein, the

quality of low-density lipoprotein, very low density lipoprotein, or a remnant Mr. lipoprotein - \*\* A cholesterol dehydrogenase \*\* beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type, A Thio-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type, beta-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidation type, Or the fixed quantity method of lipoprotein cholesterol given in either the above-mentioned \*\* which is the enzyme which carries out the catalyst of the reaction which changes a Thio-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidation type into these reduction types - \*\*, \*\* It is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase. And it is a reagent kit for carrying out a fixed quantity under coexistence of other lipoprotein fractions. The reagent kit for lipoprotein cholesterol measurement which makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a component at least, \*\* It is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase, without making the lipoprotein in a biological material condense. And it is a reagent kit for carrying out a fixed quantity under coexistence of other lipoprotein fractions, and is the reagent kit for lipoprotein cholesterol measurement which makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a component at least.

[0018] Although the terms and conditions for carrying out this invention are explained in detail hereafter, this invention is not restricted at all by the following publications.

[0019] Lipoprotein fractions, such as a remnant Mr. lipoprotein which biological materials are a blood serum, plasma, etc. in this invention, for example, HDL, LDL, very low density lipoprotein, CM and above-mentioned very low density lipoprotein, and above-mentioned CM produce in response to an operation of a lipoprotein lipase, are included. When the lipid component and apoprotein containing cholesterol combine a lipoprotein, a lipid exists in the interior, protein exists outward, and it is solubilizing in a living body.

[0020] In this invention, in order to decompose the cholesterol of the lipoprotein fraction origin of those other than the fraction made into the purpose, it is characterized by making cholesterol and a cholesterol oxidase concerned act first (the first reaction). As a cholesterol oxidase, if cholesterol can be oxidized, there will be no exceptional limit in the origin. the first reaction — pH 6.0–8.5 — it is pH 6.5 to 7.5 range preferably, and 30–37-degree C 25–40 degrees C are preferably performed for 3 – 5 minutes for 1 to 10 minutes The absorbance of the reaction solution concerned is measured after the first reaction end. Although the conditions of spectrometry change also with kinds of enzyme in the reaction row used in case the cholesterol in the fraction made into the purpose is measured, when using the conversion to a reduction type from the oxidation type of beta-nicotinamide adenine dinucleotide (nicotinamide adenine dinucleotide), using a cholesterol dehydrogenase as a coenzyme used, for example for the second reaction time of the following, they should just measure the absorbance near the wavelength of 340nm.

[0021] the second reaction for which the cholesterol in the lipoprotein fraction of pinpointing in a biological material is made to act on a cholesterol dehydrogenase — pH 7.0–10.0 — it is pH 7.5 to 8.5 range preferably, and 30–37-degree C 25–40 degrees C are preferably performed for 3 – 5 minutes for 1 to 10 minutes According to the conditions of the first reaction, an absorbance is measured after the second reaction end.

[0022] About the origin, especially a limit does not have the cholesterol dehydrogenase concerned, either, and it should just carry out the catalyst of the cholesterol dehydrogenation.

[0023] beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type (nicotinamide adenine dinucleotide), a Thio-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type (t-nicotinamide adenine dinucleotide), beta-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidation type (NADP), a Thio-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidation type (t-NADP), etc. are mentioned to the coenzyme at the time of using a cholesterol dehydrogenase in the second reaction.

[0024] It separates from the cholesterol oxidase which is carrying out to pH 8.0 or more preferably, and used pH 6.0–8.5 in the first reaction for the first reaction pH 7.5 or more at the second reaction from pH conditions [ optimum / reaction ]. Since a cholesterol dehydrogenase has optimum pH or more in pH 8.0, it acts effectively at the second reaction. Although the



fixed quantity of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction used as the purpose becomes possible according to the difference of this pH condition, you may add a 17 or more HLB [ which is the specific inhibitors to a cholesterol oxidase ] nonionic surface active agent, an ionic surfactant, or a sodium fluoride at the second reaction.

[0025] In this invention, an aggregate arises in the case of the reaction of a biological material and the enzyme concerned, and in order to prevent reaction mixture becoming muddy, compounds, such as KARIKUSU allenes and a KARIKUSU allene derivative, the poly anion, water-soluble polymer, and polysaccharide, are added. By the coordinate bond these compounds have recognized a lipoprotein front face, ionic bond, or the protein sugar chain on the front face of a lipoprotein to be, although complex is formed, condensation is not caused. That is, these complex is complex of the fusibility which does not produce muddiness in a reaction solution. These compounds mainly form LDL and a very-low-density-lipoprotein fraction, and a soluble complex, and it suppresses that the component in a lipoprotein separates.

[0026] It is not necessary to add a metal ion in this invention or, and since condensation starts a metal ion by [ a certain amount of ] carrying out concentration addition and it becomes difficult to measure these compounds, it is necessary to set up the concentration of the metal ion concerned so that condensation may not be made to cause. Although it holds down to the grade which does not exceed about 1 mM when adding a metal ion, as for a metal ion, not adding is usually desirable.

[0027] KARIKUSU allenes are the annular oligomer to which the phenol was made into the basic skeleton and the polymerization of the four to 8 molecule of a phenol was annularly carried out by the methylene group. The KARIKUSU allene derivative which introduced the water-soluble (hydrophilic property) machine into these KARIKUSU allenes is also developed. As KARIKUSU allenes and a derivative of those A KARIKUSU (4) allene [Calix(4) arene], a KARIKUSU (6) allene, A KARIKUSU (8) allene, a sulfuric-acid KARIKUSU (4) allene, a sulfuric-acid KARIKUSU (6) allene, A sulfuric-acid KARIKUSU (8) allene, an acetic-acid KARIKUSU (4) allene, an acetic-acid KARIKUSU (6) allene, Although an acetic-acid KARIKUSU (8) allene, a carboxy KARIKUSU (4) allene, a carboxy KARIKUSU (6) allene, a carboxy KARIKUSU (8) allene, a KARIKUSU (4) allene amine, a KARIKUSU (6) allene amine, a KARIKUSU (8) allene amine, etc. are mentioned It is not restricted especially on the occasion of use. The sulfuric-acid KARIKUSU allene which has succeeded in commercial production is excellent water-soluble, and handling is easy. What is necessary is just to add 0.05 to 50 mmol/L in reaction mixture under the condition which measures cholesterol in enzyme so that it may become 0.1 - 10 mmol/L preferably when applying KARIKUSU allenes or the derivative of those to cholesterol measurement. The amount of each KARIKUSU allenes in the case of being able to use one sort or two sorts or more, and using two or more sorts and the derivative of those can change KARIKUSU allenes and the derivative of those suitably within the limits of above-mentioned.

[0028] as a poly anion, sodium salt and potassium salt, such as dextran sulfate, a tungstophosphoric acid, and a heparin, mention — having — the inside of reaction mixture — 0.01-1.0 — what is necessary is just to add w/v%, so that it may become 0.05 - 0.2 w/v% preferably

[0029] a polyacrylamide, a polyacrylic acid, a polymethacrylic acid, a polyethylene glycol, etc. mention to water-soluble polymer — having — the inside of reaction mixture — 0.01-5.0 — what is necessary is just to add w/v%, so that it may become 0.05 - 0.2 w/v% preferably

[0030] lectins (concanavalin A, the Ricinus communis bean lectin, etc.), lambda-carrageenan, a kappa carrageenan, a sodium alginate, a Apo-B antiserum, and cyclodextrin mention to polysaccharide — having — the inside of reaction mixture — 0.01-2.0 — what is necessary is just to add w/v%, so that it may become 0.05 - 0.5 w/v% preferably

[0031] Although it can use all suitably if cyclodextrin (CD) can attain the purpose of this invention, partial hydroxypropyl-ized alpha-CD, partial hydroxypropyl-ized beta-CD, partial methylation alpha-CD, partial methylation beta-CD, its partial polymer-ized beta-CD, etc. are especially desirable. these CDs are independent — or it is combined and used Partial hydroxypropyl-ization means that the hydrogen atom of the hydroxyl group of the 2nd place

and/or the 6th place is replaced by the hydroxypropyl machine [for example, 2-hydroxypropyl machine "-O-CH<sub>2</sub> CH(OH) CH<sub>3</sub>"] in the glucose residue of [ 1 / at least ] the glucose residues of 6 or 7 which constitutes alpha or beta-CD. Moreover, in the glucose residue of [ 1 / at least ] the glucose residues of 6 or 7 from which partial methylation constitutes alpha or beta-CD, it says that the hydrogen atom of the hydroxyl group of the 2nd place and/or the 6th place is replaced by the methyl group. Furthermore, with partial polymerization, it sets to the glucose residue of [ 1 / at least ] the glucose residues of 7 which constitutes the beta-CD of 1. It says that a bridge is mutually constructed by the cross linking agent and two or more beta-CD molecules form polymer in the hydroxyl group of [ 1 / at least ] the hydroxyl groups of the 2nd place of the glucose residue from which the hydroxyl group of / 1 / at least ] the hydroxyl groups of the 2nd place, the 3rd place, and the 6th place constitutes other beta-CD, the 3rd place, and the 6th place by it.

[0032] If these compound groups that form a LDL fraction etc. and a soluble complex are combined and used according to the purpose, they are still more effective.

[0033] Next, the fixed quantity of the cholesterol in each fraction is explained. When carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a HDL fraction, the separated type cholesterol in lipoprotein fractions other than a HDL fraction, especially a LDL fraction becomes easy to separate by relation between salt concentration or pH at the first reaction. As a method of suppressing decomposition of LDL, addition of the KARIKUSU allenes which form a soluble complex, a KARIKUSU allene derivative, the poly anion, water-soluble polymer (water-soluble-polymer compound), and polysaccharide is mentioned. However, since various lipoproteins exist in the biological material used as the measuring object, it is difficult to suppress isolation of cholesterol completely. Therefore, the method of making decompose the separated type cholesterol concerned at the first reaction by the cholesterol oxidase, and carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a HDL fraction at the reaction of a cholesterol dehydrogenase under coexistence of the lipoprotein lipase or cholesterol hydrolase preferably, if needed by the second reaction is used together.

[0034] The addition of compounds, such as KARIKUSU allenes used in order to form a soluble complex, is as above-mentioned.

[0035] When carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a LDL fraction, while combining the conditions described previously, namely, making LDL and a soluble complex form and making it stabilize at the first reaction under the conditions of pH 6.0 to about 8.0, and about 200-500 mmol/L of ionic strength, a cholesterol oxidase is made for the cholesterol in a HDL fraction and a very-low-density-lipoprotein fraction to act under coexistence of the lipoprotein lipase or cholesterol hydrolase if needed. Salt concentration is raised for the LDL fraction which remained at the second reaction, or a surfactant is added, it decomposes, and the fixed quantity of the cholesterol in a LDL fraction is carried out at the reaction of a cholesterol dehydrogenase under coexistence of the lipoprotein lipase or cholesterol hydrolase if needed. In the first reaction time, the compound which forms LDL and a soluble complex can adjust the kind of combination and concentration suitably, and can be used.

[0036] When carrying out the fixed quantity of the cholesterol in a very-low-density-lipoprotein fraction, while combine the conditions described previously, namely, making a very-low-density-lipoprotein fraction and a soluble complex form at the first reaction under the conditions of pH 6.5 to about 8.5, and about 300-600 mmol/L of ionic strength and making it stabilize, the cholesterol in a HDL fraction and a LDL fraction is decomposed. In the first reaction time, the compound which forms very low density lipoprotein and a soluble complex can adjust the kind of combination and concentration suitably, and can be used. What is necessary is not to be restricted at all, if the enzyme reaction in the second reaction is not blocked as a means into which the soluble complex of very low density lipoprotein is made to decompose at the second reaction, but just to adjust salt concentration etc. suitably, using a surfactant, and cholic acids and an enzyme.

[0037] The cholesterol concentration in a specific lipoprotein fraction measures the absorbance in the first reaction and the second reaction, respectively, and is called for by the total of the absorbance. For example, when carrying out the fixed quantity of the cholesterol in

a HDL fraction, after measuring the absorbance in the state where the cholesterol of lipoprotein fractions other than a HDL fraction was made to decompose at the first reaction, the fixed quantity of the cholesterol in an unreacted HDL fraction can be carried out at the first reaction by measuring the absorbance in the second reaction.

[0038] Application can do the fixed quantity method concerned not only in a HDL fraction, an above-mentioned LDL fraction, and an above-mentioned very-low-density-lipoprotein fraction but in other lipoprotein fractions, such as a remnant Mr. lipoprotein fraction.

[0039] The fixed quantity method of this invention may be suitably enforced by the reagent kit of this invention. The reagent kit of this invention is blended so that a cholesterol oxidase may exist in reaction mixture at least in the first reaction preferably, and a cholesterol dehydrogenase may exist in reaction mixture at least in the second reaction. Especially the gestalt of a reagent is not limited [ shape / of the letter of dryness, and liquid ]. In a reagent kit, you may combine the reagent of two or more kinds with which the stages which the activator of an enzyme etc. may be blended and a reagent kit adds in reaction mixture, for example like the combination of the reagent for the first reaction and the reagent for the second reaction differ.

[0040] The reagent kit of this invention is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase, and it is suitably prepared so that a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase may be contained and reagents, such as an enzyme used in order to carry out the fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction as other components, may be contained. For example, the cholesterol in a HDL fraction or a LDL fraction is measured by the method of measuring a total cholesterol. The activator added under the conditions for making the reagent kit in this case complete the reaction which carries out the fixed quantity of enzymes, such as lipoprotein lipase and cholesterol esterase, and the cholesterol in addition to a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase, a stabilizing agent, a coenzyme, etc. are chosen suitably, and may be blended into a reagent kit. As a cholesterol dehydrogenase included in the kit of this invention, a nicotinamide adenine dinucleotide dependency cholesterol dehydrogenase, a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependency cholesterol dehydrogenase, etc. are illustrated like the above-mentioned.

[0041]

[Example] Although it describes hereafter about the example of a fixed quantity of each cholesterol in a HDL fraction, a LDL fraction, and a very-low-density-lipoprotein fraction in order to explain this invention to a detail more, this invention is not limited to these.

[0042] [Example 1] The compound shown in Table 1 was added to the check result buffer solution of turbidity, and it considered as the reagent. very low density lipoprotein and LDL which were obtained by ultracentrifuge (100,000G) operation, the HDL fraction, the normal Homo sapiens blood serum, and the chyle sample were used for the sample. Measurement added 180micro of reagents I to 5micro of samples I, incubated for 5 minutes at 37 degrees C, and checked muddiness with the absorbance with a dominant wavelength of 340nm at this time. The kit, data MINAL which are marketed as a contrasting method The first reagent of HDL-C (consonance Medex, Inc make), the KORESUS test HDL (the first Chemicals Industrial company make), and HDL-C direct WAKO (Wako Pure Chem make) was used. Moreover, the reagent modeled after an example given in each official report of the patent No. 2600065 official report, JP,8-201393,A, and JP,9-96637,A was also prepared. Operation followed the example the operation manual appended to the kit, and given [ each ] in an official report. A result is shown in Table 1. With the reagent which added the compound used in this invention, it turns out that muddiness has not arisen.

[0043]

[Table 1]

化 合 物 名 (濃 度)		検 体				
		VLDL	LDL	HDL	血清	乳び血清
硫酸カリクス (1mmol/l) アレン	(1mmol/l)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
硫酸カリクス (6mmol/l) アレン	(6mmol/l)	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000
硫酸カリクス (8mmol/l) アレン	(8mmol/l)	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000
デキストラン硫酸ナトリウム (0.1%)	(0.1%)	0.001	0.003	0.000	0.004	0.002
リンタンクスステン酸ナトリウム (0.1%)	(0.1%)	0.027	0.099	0.036	0.000	0.043
ポリアクリル酸 (0.1%)	(0.1%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
λ-カラギナン (0.1%)	(0.1%)	0.000	0.000	0.002	0.009	0.003
Apo-B 抗体血清 (0.24mg/ml Becker titer)	(0.24mg/ml Becker titer)	0.051	0.065	0.003	0.076	0.069
コンカナバリン A (0.05%)	(0.05%)	0.003	0.011	0.001	0.009	0.002
HP-γ-CD (0.1%)	(0.1%)	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003
DM-β-CD (0.1%)	(0.1%)	0.013	0.000	0.000	0.008	0.002
ヘパリンナトリウム (0.1%)	(0.1%)	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
アルギン酸ナトリウム (0.1%)	(0.1%)	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
PEG 2000 (0.1%)	(0.1%)	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000
PEG 4000 (0.1%)	(0.1%)	0.008	0.000	0.000	0.000	0.005
PEG 6000 (0.1%)	(0.1%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
市販キット	デクミナー-L HDL-C	++	+++	-	++	++
	コレステスト HDL	++	+++	-	++	++++
	HDL-C ダイレクトワコー	++	++	0.013	++	+++
特許第2600065 号公報		++	++	-	+++	++++
特開平8-201393 号公報		-	++	+	++	++++
特開平9-96637 号公報		++	+++	0.085	+++	++

[0044] notes 1) The upper case of each compound : the intensity of turbidity is shown. Lower berth: Change of the absorbance by the complex formation which deducted the absorbance of a sample own [ in 340nm ] is shown.

[0045] notes 2) The sign of front Naka shows the following turbidity. - : Muddiness of the Degree of +:Low Which Does Not Become Muddy, Muddiness of the Degree of Inside of ++, +++ : Advanced Muddiness, Muddiness of ++++:Intensity (2.0 or More Absorbances)

[0046] notes 3) gamma-cyclodextrin by which the hydrogen atom of the hydroxyl group of the 2nd place and the 6th place of a glucose residue with which the HP-gamma-CD of front Naka constitutes 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin, and DM-beta-CD constitutes beta-CD is replaced by the methyl group, respectively is shown, and PEG shows a polyethylene glycol.

[0047] [Example 2] Reagent 1-A below the fixed quantity of the cholesterol in a HDL fraction, reagent 1-B, and the reagent 2 were prepared, and HDL cholesterol concentration was measured. Ten blood serums of the man in the street were used for the sample. Measurement was carried out with the Hitachi 7170 type automatic analyzer. Operation information 180microl Added reagent 1-A or reagent 1-B to 5micro of samples I first, it carried out constant temperature for 5 minutes at 37 degrees C, and it measured the absorbance 1 by the dominant wavelength of 340nm, and 570nm of complementary-wave length at this time.

[0048] Furthermore, the reagent 2 was 60microl Added, constant temperature was carried out for 5 minutes at 37 degrees C, and the absorbance 2 was measured by the dominant wavelength of 340nm, and 570nm of complementary-wave length at this time.

[0049] The difference of an absorbance 1 and an absorbance 2 was searched for, and the value of a sample was converted by making control of known HDL cholesterol concentration into the standard solution. The polyethylene-glycol (PG) method was used as a contrasting method. The PG method used PG pole by International Reagents Corp. Moreover, it asked for

the cholesterol concentration of the supernatant liquid after centrifugal using the I-CHO reagent by International Reagents Corp., and A. Comparison with the contrasting method was shown in Table 2 as a measurement result. At reagent 1-A by which the cholesterol oxidase is not added, although the high price was shown compared with the contrasting method, by reagent 1-B by which the cholesterol oxidase was added, a result of the contrasting method and a good result which was well in agreement were brought.

[0050]

Manufacture of reagent 1-A Buffer solution pH6.5 2 hydrazinium chlorides 80 mmol/L Sulfuric-acid KARIKUSU (6) allene 1.0 mmol/L beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type [nicotinamide adenine dinucleotide]

5.0 mmol/L [0051]

Manufacture of reagent 1-B Buffer solution pH6.5 2 hydrazinium chlorides 80 mmol/L Sulfuric-acid KARIKUSU (6) allene 1.0 mmol/L beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type [nicotinamide adenine dinucleotide]

5.0 mmol/L Cholesterol oxidase 10 U/ml. [0052]

Manufacture of a reagent 2 Buffer solution pH8.5 Cholesterol dehydrogenase 20 U/ml

Cholesterol hydrolase 6 U/ml. [0053]

[Table 2]

単位: mg/dl

検体	対 照 法	試薬 1 - A	試薬 1 - B
1	46.7	54.1	47.3
2	33.1	40.7	32.2
3	52.4	62.3	56.0
4	27.0	41.1	32.5
5	40.0	49.2	42.7
6	31.4	38.9	32.1
7	70.4	76.4	70.0
8	84.5	93.2	84.2
9	29.5	43.4	36.6
10	57.5	63.3	58.8

[0054] [Example 3] The reagent 1 and reagent 2 below the fixed quantity of the cholesterol in a LDL fraction were prepared, and LDL-cholesterol concentration was measured. Ten blood serums of the man in the street were used for the sample. Measurement was carried out with the Hitachi 7170 type automatic analyzer. Operation information 210microl Added the reagent 1 to 3micro of samples I first, it carried out constant temperature for 5 minutes at 37 degrees C, and it measured the absorbance 1 by the dominant wavelength of 340nm, and 570nm of complementary-wave length at this time.

[0055] Furthermore, the reagent 2 was 70microl Added, constant temperature was carried out for 5 minutes at 37 degrees C, and the absorbance 2 was measured by the dominant wavelength of 340nm, and 570nm of complementary-wave length at this time.

[0056] The difference of an absorbance 1 and an absorbance 2 was searched for, and the value of a sample was converted by making control of known LDL-cholesterol concentration into the standard solution. By the contrasting method, it asked for LDL-cholesterol concentration by the free DEWARUDO formula. PG pole by International Reagents Corp. was used for the HDL cholesterol value. The total-cholesterol value was calculated using the T-CHO reagent by International Reagents Corp., and A. TG value was calculated using TG reagent by International Reagents Corp., and A. Comparison with the contrasting method was shown in Table 3 as a measurement result. This method brought a result of the contrasting method, and a good result which was well in agreement.

[0057]

Manufacture of a reagent 1 Buffer solution pH7.0 Sulfuric-acid KARIKUSU (6) allene 1.0

manufacture of a reagent 1 Buffer solution pH7.0 Sulfuric-acid KARINOSO (G) allene 1.0 mmol/L Cholesterol dehydrogenase 20 U/ml beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type [nicotinamide adenine dinucleotide]

5.0 mmol/L Cholesterol oxidase 10 U/ml Cholesterol hydrolase 1 U/ml. [0058]

Manufacture of a reagent 2 Buffer solution pH8.5 2 hydrazinium chlorides 300 mmol/L Cholesterol hydrolase 3 U/ml. [0059]

[Table 3]

単位：mg/dl

検体	対照法	本 法
1	118	116
2	178	177
3	58	45
4	137	145
5	113	117
6	80	80
7	102	104
8	93	94
9	192	194
10	120	128

[0060] [Example 4] The reagent 1 and reagent 2 below the fixed quantity of the cholesterol in a very-low-density-lipoprotein fraction were prepared, and very-low-density-lipoprotein-cholesterol concentration was measured. Five blood serums of the man in the street were used for the sample. Measurement was carried out with the Hitachi 7170 type automatic analyzer. Operation information 180microl Added the reagent 1 to 5micro of samples I first, it carried out constant temperature for 5 minutes at 37 degrees C, and it measured the absorbance 1 by the dominant wavelength of 340nm, and 570nm of complementary-wave length at this time.

[0061] Furthermore, the reagent 2 was 60microl Added, constant temperature was carried out for 5 minutes at 37 degrees C, and the absorbance 2 was measured by the dominant wavelength of 340nm, and 570nm of complementary-wave length at this time. The difference of an absorbance 1 and an absorbance 2 was searched for, and the value of a sample was converted by making the blood serum of known very-low-density-lipoprotein-cholesterol concentration into the standard solution. The ultracentrifugal method was used as a contrasting method. Comparison with the contrasting method was shown in Table 4 as a measurement result. This method brought a result of the contrasting method, and a good result which was well in agreement.

[0062]

Manufacture of a reagent 1 Buffer solution pH8.0 Cholesterol dehydrogenase 20 U/ml beta-nicotinamide adenine dinucleotide oxidation type [nicotinamide adenine dinucleotide]

5.0 mmol/L Sodium chloride 100 mmol/L Cholic-acid sodium 0.1 % cholesterol oxidase 10 U/ml Cholesterol hydrolase 1 U/ml. [0063]

Manufacture of a reagent 2 Buffer solution pH8.5 2 hydrazinium chlorides 300 mmol/L Triton X-100 0.4 % cholesterol hydrolase 3 U/ml. [0064]

[Table 4]

単位：mg/dl

検体	対照法	本 法
1	15.2	13.2
2	13.6	11.2
3	26.2	24.5
4	41.0	45.6
5	22.2	18.5

[0065]

[Effect of the Invention] According to this invention, it becomes possible by making it react with a cholesterol oxidase at the first reaction, and making it react with a cholesterol dehydrogenase at the second reaction to eliminate the influence of the cholesterol of the fraction origin of those other than the lipoprotein fraction made into the purpose.

[0066] The fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction can be carried out without making the lipoprotein in a biological material condense furthermore according to this

invention. That is, it becomes possible to carry out the fixed quantity of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction alternatively, without [ without it makes the reagent for measurement condense the lipoprotein in a biological material by including KARIKUSU allenes, the derivative of those, the poly anion, polysaccharide, such as cyclodextrin, water-soluble polymer, etc. in reaction mixture, and ] being influenced of other lipoproteins.

[0067] From the above thing, by the method of using the reagent kit of this invention for the method row of this invention, since separation fractionation, such as centrifugal fractionation, is unnecessary, operation is simple and the problem in a measurement error or an artificial factor can be reduced.

[0068] Moreover, since it is applicable to the method using two kinds of reagents, the continuous measurement using the general-purpose type automatic analyzer is attained, and it can multichannel-ize with other inspection items, and can measure.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-155595

(43)公開日 平成11年(1999) 6 月15日

(51)IntCl<sup>4</sup>

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/32

C 1 2 Q 1/32

1/26

1/26

1/60

1/60

G 0 1 N 33/92

G 0 1 N 33/92

A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21)出願番号

特願平9-325023

(22)出願日

平成9年(1997)11月26日

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 岸 浩司

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 角山 功

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 白波瀬 泰史

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(74)代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リポ蛋白質コレステロールの定量方法および試薬キット

(57)【要約】

【解決手段】 他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定する。その後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定する。吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロール濃度を求める。特に反応液中に濁りを生じない条件下で行う。

【効果】 特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することができる。遠心分離などの分離分画が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、他のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項2】 生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、少なくとも生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にリボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させ、且つ当該反応時に凝集物を生じさせないようにすることを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項3】 リボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物が、カリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマーおよび多糖類から選ばれる少なくとも一種である請求項2記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項4】 生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、生体試料中のリボ蛋白質の凝集を生じさせない条件下で、他のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項5】 特定のリボ蛋白質が、高比重リボ蛋白質、低比重リボ蛋白質、超低比重リボ蛋白質またはレムナント様リボ蛋白質である請求項1～4のいずれかに記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項6】 コレステロール脱水素酵素が、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型、またはThio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型をこれらの還元型に変換する反応を触媒する酵素である請求項1～5のいずれかに記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項7】 特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリボ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要

素とするリボ蛋白質コレステロール測定用試薬キット。

【請求項8】 生体試料中のリボ蛋白質を凝集させずに、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリボ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリボ蛋白質コレステロール測定用試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 10 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床診断の分野において、生体試料中のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量する方法、およびこの方法に好適に用いられる試薬キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術】古くからリボ蛋白質は、超遠心操作により、高比重リボ蛋白質（HDL、比重1.063～1.21）、低比重リボ蛋白質（LDL、比重1.019～1.063）、超低比重リボ蛋白質（VLDL、比重1.006～1.019）、カイロミクロン（CM、比重<1.006）に分画されている。この分画操作は、超遠心機を必要とする上に、遠心は数日に亘って行わなければならない、多検体を処理することは出来なかった。これに代わりポリエチレングリコールまたはデキストラン硫酸等のポリアニオンに、マグネシウムやカルシウム等の二価カチオンを共存させたり、リンタングステン酸に二価カチオンを共存させた分画剤なる溶液と血清とを混和させてLDL、VLDL、CMを沈澱させ、遠心後の上清に残るHDLのみを分画する方法が主流となっていた。この方法は、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置を用いることが出来た。即ち、分画したHDL画分中のコレステロールは、酵素法による総コレステロールの測定が自動分析機で確立しているため、それを応用してHDL画分中のコレステロール濃度を求めることが出来た。

【0003】しかしながら、この方法も低速とは言え遠心操作が必要であり、分画剤と血清とを混和させるときの人為的な定量誤差や検体の取り違いなどが問題となっていた。その上、自動分析装置で他の一般的な生化学項目と同時に測定出来なかった。臨床検査は迅速対応が求められており、この事からも検査時間の短縮が課題となっていた。

【0004】一方、臨床的には動脈硬化のリスクファクターであるLDL画分中のコレステロール値を重視する報告〔総コレステロールの基準値と設定根拠、動脈硬化、24（6）、260（1996）〕もある。現在LDL画分中のコレステロール値は総コレステロール（ $T-CHO$ ）、中性脂肪（ $TG$ ）及びHDL画分中のコレステロールの測定結果から経験的なファクターを代入して求める。その式〔Friedewald WT, et

al, Clin. Chem., 18, 499-502 (1972)) を以下に示す。

【0005】LDL画分中のコレステロール値 = (T-CHO値) - (HDL画分中のコレステロール値) - (TG値) / 5

【0006】この方法では、測定する3項目が全て正確に測定されなければ成立しない。また、TG値が400 mg/dlを越えたり、LDL画分中のコレステロール濃度が100mg/dl以下になると計算値がLDL画分中のコレステロール濃度を反映しなくなると言われている [Warnick GR, et al, Clin. Chem. 36 (1), 15-19 (1990)、Mc Namara JR, et al, Clin. Chem. 36 (1), 36-42 (1990)]。従って、肝心の異常値が求められない方法である。他に、電気泳動でリポ蛋白を分離し蛋白量を測定する方法やHPLCによるリポ蛋白別コレステロールの測定方法もあるが、検体処理能力に欠ける方法であり、高価な装置も必要となる。

【0007】近年、HDL画分中のコレステロール測定に関して前述した問題を解決するため、全自動のHDL画分中のコレステロールを測定するキットが開発され普及しつつある。特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報及び特開平8-131195号公報に観られる技術は分画剤を併用するが、分画剤に含まれる二価カチオンとして用いられる金属が自動分析装置で一般的に使用される洗剤により不溶性の沈澱物を形成し、それが廃液機構で蓄積することにより故障の原因となっている。更に反応液中に不溶性の凝集物を形成し、測定結果に影響を与える濁りが生じて測定誤差の原因となっているばかりか、凝集物により反応セルが汚染されて、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与えている。

【0008】普及しているほとんどの自動分析装置は、10分で反応を完了する場合が多い。このとき反応中に濁度変化があつては測定値の正確性に問題がある。その他、反応液が濁ると再現性が低下するという問題も加わる。それ故、測定する検体に制限が加わり、幅広い測定波長と多種多様な患者検体に対応することが出来ない。例えば、340nm付近(UV域)では凝集物による濁りの現象により、吸光度が2~3以上となり分析機の許容範囲をしばしば越えてしまう欠点がある。

【0009】二価カチオンを用いることのない特開平9-96637号公報の技術は、リポ蛋白と凝集する抗血清を含ませる方法であるが、これも難溶性の抗原抗体凝集物を形成するので、反応セルが汚染される。従って、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与える。また、反応液中の濁りが強度となるので、特にUV領域によるHDL画分中のコレステロール測定に対しても前述と同じ原因で正確な測定が不可能

である。高波長域でも濁りの影響で測定値の正確性に欠ける。

【0010】また、このような濁りを最終的に消去する技術である特開平6-242110号公報もあるが、この方法だと最低でも3~4段階の試薬分注操作が必要となり、一般的に普及している生化学項目用の自動分析機は最大二段階のものが主流であるので応用出来ないことが多い。一方、LDL画分中のコレステロールの測定に至っては、現在も計算による方法を探らざるを得ない状況である。

【0011】臨床検査に用いる測定用試薬は、その汎用性を重視するため、緩衝能の維持、安定化、試薬の液状化、防腐効果、短時間測定のため、酵素の活性化等の工夫がなされている。

【0012】コレステロール脱水素酵素(CDH)を用いるコレステロールの測定には反応時間の短縮を目的としたヒドラジン類の添加が必要となる(特開平5-176797号公報)。しかしながらこの方法では、第一反応でヒドラジン類を存在させるので反応液が高イオン強度下となり、さらに第二反応ではCDHの至適pHである8.0付近、すなわちアルカリ性側に反応液を変動させたり、コレステロール脱水素酵素やコレステロールエステラーゼの活性化剤である界面活性剤を添加すると、可溶性複合体とした目的物質以外のものが分解し、その分解物が本反応に関与し、測定値のばらつきの原因となる。

【0013】HDL画分中のコレステロールを測定する条件において、本反応に関与し易い物質としては、LDL画分中の表面に存在する遊離型コレステロールが挙げられる。これらの分解を抑える方法としては、ポリアニオン、二価金属イオン、水溶性高分子化合物または目的物質以外のものに対する抗体を単独あるいは二種以上を組み合わせて添加し、凝集物あるいは免疫複合体を形成させることにより、本反応への関与を抑えることが可能である。

【0014】しかし、これらの凝集物および免疫複合体による濁りの生成は、CDHを用いた波長340nmにおける紫外測定方法(UV法)では前述の様々な問題も大きな障害となる。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】このような状況に鑑み、本発明者らは、汎用の自動分析機を用いて遠心操作による分離をせずに、また反応中に濁りを生じさせることなく、生体試料中のHDLやLDLなどのリポ蛋白質の画分中のコレステロールを定量する方法、およびこの方法に好適に用いられる試薬キットについて鋭意研究を行った。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、予め反応液中で測定誤差となる目的以外のリポ蛋白質画分中のコ

レステロールをコレステロール酸化酵素で反応させて分解させた後、次いで目的とするリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素などを用いて測定する方法を見い出した。さらに、本発明者らは、生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にカリクスアレン類およびその誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー、多糖類等のリポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させることにより（即ち添加することにより）、反応液中に濁りを生じることなく、リポ蛋白質画分中のコレステロールの各種分別定量が可能であることを見い出した。

【0017】すなわち、本発明は、①生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法、②生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、少なくとも生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にリポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させ、且つ当該反応時に凝集物を生じさせないようにすることを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法、③リポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物が、カリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマーおよび多糖類から選ばれる少なくとも一種である上記②記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法、④生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、生体試料中のリポ蛋白質の凝集を生じさせない条件下で、他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法、⑤特定のリポ蛋白質が、高比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、超低比重リポ蛋白質またはレムナント様リポ蛋白質である上記①～④のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法、⑥コレステロール脱水素酵素が、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ

アミドアデニンジヌクレオチドリ

酸酸化型をこれらの還元型に変換する反応を触媒する酵素である上記①～⑤のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法、⑦特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリポ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリポ蛋白質コレステロール測定用試薬キット、⑧生体試料中のリポ蛋白質を凝集させずに、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリポ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリポ蛋白質コレステロール測定用試薬キットである。

【0018】以下、本発明を実施するための諸条件について詳細に説明するが、本発明は以下の記載により何ら制限されるものではない。

【0019】本発明において生体試料とは、血清や血漿などであり、例えば前述のHDL、LDL、VLDL、CMおよびVLDLやCMがリポ蛋白質リパーゼの作用を受けて生じるレムナント様リポ蛋白質等のリポ蛋白質画分を含むものである。リポ蛋白質は、コレステロールを含む脂質成分とアポ蛋白質とが結合することにより内部に脂質、外向きに蛋白質が存在するものであり、生体中で可溶化している。

【0020】本発明においては、目的とする画分以外のリポ蛋白質画分由来のコレステロールを分解する為に、まず当該コレステロールとコレステロール酸化酵素を作用させることを特徴とする（第一反応）。コレステロール酸化酵素としては、コレステロールを酸化することができるものであれば、その由来等には格別の制限はない。第一反応は、pH6.0～8.5、好ましくはpH6.5～7.5の範囲で、25～40℃、好ましくは30～37℃、1～10分、好ましくは3～5分間行う。第一反応終了後、当該反応溶液の吸光度を測定する。吸光度測定の条件は、目的とする画分中のコレステロールを測定する際に利用する反応ならびに酵素の種類によっても異なるが、例えば下記第二反応時に使用する補酵素として、コレステロール脱水素酵素を用いて、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）の酸化型から還元型への変換を利用する場合は、波長340nm付近での吸光度を測定すればよい。

【0021】生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素に作用させる第二反応は、pH7.0～10.0、好ましくはpH7.5～8.5の範囲で、25～40℃、好ましくは30～37℃、1～10分、好ましくは3～5分間行う。第二反応終了後、第一反応の条件に準じて吸光度を測定

する。

【0022】当該コレステロール脱水素酵素もその由来等については特に制限はなく、コレステロール脱水素反応を触媒するものであればよい。

【0023】第二反応においてコレステロール脱水素酵素を用いる際の補酵素には、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(t-NA D)、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ 10 ン酸酸化型(NADP)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ ン酸酸化型(t-NADP)等が挙げられる。

【0024】第一反応におけるpH6.0~8.5を第二反応でpH7.5以上、好ましくはpH8.0以上 20 することで、第一反応に使用したコレステロール酸化酵素は反応に至適なpH条件から外れる。コレステロール脱水素酵素はpH8.0以上に至適pHを有する為、第二反応で効果的に作用する。このpH条件の差により、目的となる特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールの 20 定量が可能となるが、コレステロール酸化酵素に対する特異的な阻害物質であるHLB17以上の非イオン界面活性剤もしくはイオン性界面活性剤、またはフッ化ナトリウム等を第二反応で添加してもよい。

【0025】本発明においては、生体試料と当該酵素の反応の際、凝集物が生じ、反応液が濁るのを防ぐ為に、カリクスアレン類およびカリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー、多糖類等の化合物が添加される。これらの化合物は、リポ蛋白質表面とイオン結合または、リポ蛋白質表面の蛋白糖鎖を認識した配位結合により、複合体を形成するが凝集は起こさない。即ち、これらの複合体は、反応溶液中に濁りを生じない可溶性の複合体である。これらの化合物は主にLDL及びVLDL画分と可溶性複合体を形成し、リポ蛋白質中の成分が遊離するのを抑制する。

【0026】これらの化合物は、金属イオンをある程度の濃度添加することにより凝集がおこり測定困難となるので、本発明においては金属イオンを添加しないか、当該金属イオンの濃度を凝集をおこさせないように設定する必要がある。金属イオンを添加する場合は約1mMを超えない程度に抑えるが、通常は金属イオンは添加しないことが好ましい。

【0027】カリクスアレン類は、フェノールを基本骨格とし、フェノールの4~8分子をメチレン基で環状に重合させた環状オリゴマーである。これらのカリクスアレン類に水溶性(親水性)基を導入したカリクスアレン誘導体も開発されている。カリクスアレン類およびその誘導体としては、カリクス(4)アレン[Calix(4)arene]、カリクス(6)アレン、カリクス(8)アレン、硫酸カリクス(4)アレン、硫酸カリクス(6)アレン、硫酸カリクス(8)アレン、酢酸カリ 50

クス(4)アレン、酢酸カリクス(6)アレン、酢酸カリクス(8)アレン、カルボキシカリクス(4)アレン、カルボキシカリクス(6)アレン、カルボキシカリクス(8)アレン、カリクス(4)アレンアミン、カリクス(6)アレンアミン、カリクス(8)アレンアミンなどが挙げられるが、使用に際しては特に制限されない。製品化に成功している硫酸カリクスアレンが水溶性に優れ取扱いが容易である。カリクスアレン類またはその誘導体をコレステロール測定に応用する場合、コレステロールを酵素的に測定する条件下に、反応液中に0.05~50mmol/L、好ましくは0.1~10mmol/Lとなるように添加すればよい。カリクスアレン類およびその誘導体は、1種または2種以上を用いることができ、2種以上用いる場合の各カリクスアレン類およびその誘導体の量は上述の範囲内で適宜変更し得る。

【0028】ポリアニオンとしては、デキストラン硫酸、リンタングステン酸、ヘパリンなどのナトリウム塩やカリウム塩が挙げられ、反応液中に0.01~1.0w/v%、好ましくは0.05~0.2w/v%となるように添加すればよい。

【0029】水溶性ポリマーには、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリエチレングリコール等が挙げられ、反応液中に0.01~5.0w/v%、好ましくは0.05~0.2w/v%となるように添加すればよい。

【0030】多糖類には、レクチン(コンカナバリンA、ヒマメレクチン等)、 $\lambda$ -カラギーナン、 $\kappa$ -カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、Apo-B抗血清、シクロデキストリン類が挙げられ、反応液中に0.01~2.0w/v%、好ましくは0.05~0.5w/v%となるように添加すればよい。

【0031】シクロデキストリン(CD)類は、本発明の目的が達成できるものであればいずれも好適に使用できるが、とりわけ部分ヒドロキシプロピル化 $\alpha$ -CD、部分ヒドロキシプロピル化 $\beta$ -CD、部分メチル化 $\alpha$ -CD、部分メチル化 $\beta$ -CD、部分ポリマー化 $\beta$ -CD等が好ましい。これらCD類は、単独または組み合わせて用いられる。部分ヒドロキシプロピル化とは、 $\alpha$ または $\beta$ -CDを構成する6または7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基において、2位および/または6位の水酸基の水素原子がヒドロキシプロピル基[例えば2-ヒドロキシプロピル基「 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ 」]に置換されていることをいう。また、部分メチル化とは、 $\alpha$ または $\beta$ -CDを構成する6または7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基において、2位および/または6位の水酸基の水素原子がメチル基に置換されていることをいう。さらに、部分ポリマー化とは、一の $\beta$ -CDを構成する7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基において、2位、3位および6位の水酸基のうち少なくと 50

も一の水酸基が、他の $\beta$ -CDを構成するグルコース残基の2位、3位および6位の水酸基のうち少なくとも一の水酸基に、架橋剤によって相互に架橋され、複数の $\beta$ -CD分子がポリマーを形成することをいう。

【0032】LDL画分等と可溶性複合体を形成するこれらの化合物群は、目的に応じて組み合わせて使用するとさらに効果的である。

【0033】次に各画分中のコレステロールの定量について説明する。HDL画分中のコレステロールを定量する場合、第一反応でHDL画分以外のリポ蛋白質画分、特にLDL画分中の遊離型コレステロールが塩濃度やpHの関係で遊離し易くなる。LDLの分解を抑える方法として、可溶性複合体を形成するカリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー（水溶性高分子化合物）、多糖類の添加が挙げられる。しかしながら、測定対象となる生体試料には多種多様なリポ蛋白質が存在するため、コレステロールの遊離を完全に抑制することは難しい。従って好ましくは、当該遊離型コレステロールをコレステロール酸化酵素による第一反応にて分解させ、第二反応でHDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポプロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール脱水素酵素の反応にて定量する方法が併用される。

【0034】可溶性複合体を形成するために用いられるカリクスアレン類等の化合物の添加量は前述のとおりである。

【0035】LDL画分中のコレステロールを定量する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、即ちpH6.0～8.0程度、イオン強度200～500mmol/L程度の条件下で、第一反応でLDLと可溶性複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL画分およびVLDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポプロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール酸化酵素を作用させる。残ったLDL画分を第二反応にて塩濃度を高めたり界面活性剤を添加したりして分解し、LDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポプロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール脱水素酵素の反応にて定量する。第一反応時において、LDLと可溶性複合体を形成する化合物は、その種類の組み合わせと濃度を適宜調整して用いることができる。

【0036】VLDL画分中のコレステロールを定量する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、即ちpH6.5～8.5程度、イオン強度300～600mmol/L程度の条件下で、第一反応でVLDL画分と可溶性複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL画分およびLDL画分中のコレステロールを分解する。第一反応時において、VLDLと可溶性複合体を形成する化合物は、その種類の組み合わせと濃度を適宜調整して用いることができる。第二反応でVLDLの可溶性複合体を分

解させる手段としては、第二反応における酵素反応を妨害しなければ何等制限されず、界面活性剤、コール酸類や酵素を用いるか、塩濃度等を適宜調整すればよい。

【0037】特定のリポ蛋白質画分中のコレステロール濃度は、第一反応および第二反応における吸光度をそれぞれ測定し、その吸光度の差引により求められる。例えば、HDL画分中のコレステロールを定量する場合、HDL画分以外のリポ蛋白質画分のコレステロールを第一反応で分解させた状態での吸光度を測定した後、第二反応での吸光度を測定することにより、第一反応で未反応のHDL画分中のコレステロールを定量することができる。

【0038】当該定量方法は、上述のHDL画分、LDL画分およびVLDL画分のみならず、レムナント様リポ蛋白質画分等の他のリポ蛋白質画分にも応用ができる。

【0039】本発明の定量方法は、本発明の試薬キットによって好適に実施され得る。本発明の試薬キットは、好ましくは第一反応においてコレステロール酸化酵素が少なくとも反応液中に存在するように、第二反応においてコレステロール脱水素酵素が少なくとも反応液中に存在するように配合されたものである。試薬の形態は、乾燥状、液状など特に限定されるものではない。試薬キット中には、酵素の活性化剤などが配合されていてもよく、また試薬キットが、例えば第一反応用試薬と第二反応用試薬との組合せのように、反応液中に添加する時期が異なる複数の種類の試薬を組み合わせたものであってもよい。

【0040】本発明の試薬キットは、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、コレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有し、その他の成分として、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量するために用いられる酵素等の試薬を含有するように適宜調製される。例えば、HDL画分やLDL画分中のコレステロールは、総コレステロールを測定する方法により測定される。この際の試薬キットには、コレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素に加えて、リポプロテインリパーゼ、コレステロールエステラーゼ等の酵素、コレステロールを定量する反応を完成させるための条件下で添加する活性化剤、安定化剤、補酵素等が適宜選択され、試薬キット中に配合され得る。本発明のキットに含められるコレステロール脱水素酵素としては前述の如く、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存性コレステロール脱水素酵素、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート依存性コレステロール脱水素酵素等が例示される。

【0041】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するために、HDL画分、LDL画分及びVLDL画分中の各コレス

テロールの定量例について記すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

# 【0042】【実施例1】 濁度の確認結果

緩衝液に表1に示す化合物を添加し、試薬とした。検体は、超遠心(100,000G)操作で得たVLDL、LDL、HDL画分と正常なヒト血清および乳び検体を用いた。測定は、検体5μlに試薬180μlを加え37℃で5分間インキュベートし、この時点で主波長340nmの吸光度と濁りの確認を行った。対照法として市販されているキット、デタミナーL HDL-C (協和メデックス (株) 社製)、コレステストHDL (第一化\*

\*学薬品工業 (株) 社製)、HDL-Cダイレクトワーク(和光純薬 (株) 社製)の第一試薬を用いた。また、特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報、特開平9-96637号公報の各公報に記載の実施例を参考にした試薬も調製した。操作はキットに添付されている取り扱い説明書及び各公報記載の実施例に従った。結果を表1に示す。本発明において用いられる化合物を添加した試薬では、濁りが生じていないことがわかる。

# 【0043】

【表1】

化 合 物 名 (濃 度)		検 体				
		VLDL	LDL	HDL	血清	乳び血清
硫酸カリクス(4)アレン (1mmol/l)		- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.000
硫酸カリクス(6)アレン (1mmol/l)		- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.005	- 0.000
硫酸カリクス(8)アレン (1mmol/l)		- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.005	- 0.000
デキストラン硫酸ナトリウ (0.1%)		- 0.001	- 0.003	- 0.000	- 0.004	- 0.002
ランタニングスチレン酸ナトリ (0.1%)		- 0.027	+ 0.099	- 0.036	- 0.000	- 0.043
ポリアクリル酸 (0.1%)		- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.003
λ-カラギーナン (0.1%)		- 0.000	- 0.000	- 0.002	- 0.009	- 0.003
A.P.O.-B抗血清 (0.24mg/ml Becker titer)		+ 0.051	+ 0.065	- 0.003	+ 0.076	+ 0.069
コンカナバリンA (0.05%)		- 0.003	- 0.011	- 0.001	- 0.009	- 0.002
H.P.-γ-CD (0.1%)		- 0.003	- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.003
DM-β-CD (0.1%)		- 0.013	- 0.000	- 0.000	- 0.008	- 0.002
ヘパリンナトリウム (0.1%)		- 0.001	- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.000
アルギン酸ナトリウム (0.1%)		- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.003	- 0.000
PEG200 (0.1%)		- 0.001	- 0.002	- 0.000	- 0.000	- 0.000
PEG400 (0.1%)		- 0.008	- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.005
PEG600 (0.1%)		- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.000	- 0.000
市販キット	デタミナーL HDL-C	++ 0.106	+++ 1.060	- 0.006	++ 0.186	++ 0.873
	コレステスト HDL	++ 0.241	+++ 1.341	- 0.004	++ 0.565	++++ 2.277
	HDL-Cダイレ クトワーク	++ 0.216	++ 0.487	- 0.013	++ 0.596	+++ 1.496
特許第2600065 号公報		++ 0.161	++ 0.831	- 0.000	+++ 1.913	++++ 3.220
特開平8-201393号公報		- 0.026	++ 0.101	+ 0.099	++ 0.354	++++ 2.093
特開平9-96637 号公報		++ 0.522	+++ 2.604	- 0.045	+++ 1.008	++ 0.874

【0044】注1) 各化合物の上段：濁度の強度を示す。下段：340nmにおける検体自身の吸光度を差し引いた複合体形成による吸光度の変化を示す。

【0045】注2) 表中の記号は、以下の濁度を示す。

—：濁らない、+：低度の濁り、++：中度の濁り、+

++：高度の濁り、++++：強度の濁り(吸光度2.0以上)

【0046】注3) 表中のHP-γ-CDは2-ヒドロキシプロピル-γ-シクロデキストリンを、DM-β-CDはβ-CDを構成するグルコース残基の2位および

6位の水酸基の水素原子がそれぞれメチル基に置換されているγ-シクロデキストリンを示し、PEGはポリエチレングリコールを示す。

【0047】〔実施例2〕 HDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1-A、試薬1-Bおよび試薬2を調製し、HDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体5μlに試薬1-Aまたは試薬1-Bを180μl加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0048】さらに、試薬2を60μl加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長\*

#### 試薬1-Aの調製

緩衝液	pH6.5
二塩化ヒドラジニウム	80 mmol/L
硫酸カリクス(6)アレン	1.0 mmol/L
β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型[NAD]	5.0 mmol/L

【0051】

#### 試薬1-Bの調製

緩衝液	pH6.5
二塩化ヒドラジニウム	80 mmol/L
硫酸カリクス(6)アレン	1.0 mmol/L
β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型[NAD]	5.0 mmol/L
コレステロール酸化酵素	10 U/ml

【0052】

#### 試薬2の調製

緩衝液	pH8.5
コレステロール脱水素酵素	20 U/ml
コレステロール加水分解酵素	6 U/ml

【0053】

【表2】

単位: mg/dl

検体	対 照 法	試薬1-A	試薬1-B
1	46.7	54.1	47.3
2	33.1	40.7	32.2
3	52.4	62.3	56.0
4	27.0	41.1	32.5
5	40.0	49.2	42.7
6	31.4	38.9	32.1
7	70.4	76.4	70.0
8	84.5	93.2	84.2
9	29.5	43.4	36.6
10	57.5	63.3	58.8

【0054】〔実施例3〕 LDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1および試薬2を調製し、LDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施し

\*570nmで吸光度2を測定した。

【0049】吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のHDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法としてポリエチレングリコール(PG)法を用いた。PG法は国際試薬(株)製PGボールを使用した。また、遠心後の上清のコレステロール濃度は、国際試薬(株)製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表2に示した。コレステロール酸化酵素が添加されていない試薬1-Aでは、対照法に比べて高値を示すが、コレステロール酸化酵素が添加された試薬1-Bでは、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0050】

た。操作法は、先ず検体3μlに試薬1を210μl加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0055】さらに、試薬2を70μl加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度2を測定した。

【0056】吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のLDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法では、フリーデワルド式によりLDL-コレステロール濃度を求めた。HDLコレステロール値は、国際試薬(株)製PGボールを使用した。総コレステロール値は、国際試薬(株)製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。TG値は、国際試薬(株)製TG試薬・Aを用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表3に示した。本法は、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0057】

## 試薬1の調製

緩衝液	pH 7. 0
硫酸カリクス (6) アレン	1. 0 mmol/L
コレステロール脱水素酵素	20 U/ml
$\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 [NAD]	5. 0 mmol/L
コレステロール酸化酵素	10 U/ml
コレステロール加水分解酵素	1 U/ml

【0058】

## 試薬2の調製

緩衝液	pH 8. 5
二塩化ヒドラジニウム	300 mmol/L
コレステロール加水分解酵素	3 U/ml

【0059】

【表3】

単位: mg/dl

検体	対照法	本 法
1	118	116
2	178	177
3	58	45
4	137	145
5	113	117
6	80	80
7	102	104
8	93	94
9	192	194
10	120	128

【0060】【実施例4】 VLDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1および試薬2を調製し、VLDL-コレス\*

## 試薬1の調製

緩衝液	pH 8. 0
コレステロール脱水素酵素	20 U/ml
$\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 [NAD]	5. 0 mmol/L
塩化ナトリウム	100 mmol/L
コール酸ナトリウム	0. 1 %
コレステロール酸化酵素	10 U/ml
コレステロール加水分解酵素	1 U/ml

【0063】

## 試薬2の調製

緩衝液	pH 8. 5
二塩化ヒドラジニウム	300 mmol/L
トリトンX-100	0. 4 %
コレステロール加水分解酵素	3 U/ml

【0064】

【表4】

単位: mg/dl

検体	対照法	本 法
1	15. 2	13. 2
2	13. 6	11. 2
3	26. 2	24. 5
4	41. 0	45. 6
5	22. 2	18. 5

50 【0065】

\*テロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清5例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体5 $\mu$ lに試薬1を180 $\mu$ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0061】さらに、試薬2を60 $\mu$ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のVLDL-コレステロール濃度の血清を標準液として検体の値を換算した。対照法として超遠心法を用いた。測定結果として対照法との比較を表4に示した。本法は、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0062】



17

【発明の効果】本発明によれば、第一反応でコレステロール酸化酵素と反応させ、第二反応でコレステロール脱水素酵素と反応させることにより、目的とするリポ蛋白質画分以外の画分由来のコレステロールの影響を排除することが可能となる。

【0066】さらに本発明によれば、生体試料中のリポ蛋白質を凝集させることなく、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することができる。すなわち、測定用試薬に、カリクスアレン類やその誘導体、ポリアニオン、多糖類（シクロデキストリン類など）、水溶性ポリマー等を反応液中に含ませることにより、生体試料中のリポ蛋白質を凝集させることなく、且つ他のリポ蛋

18

白質の影響を受けることなく、選択的に特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することが可能となる。

【0067】以上のことより、本発明の方法ならびに本発明の試薬キットを用いる方法では、遠心分画などの分離分画が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。

【0068】また、二種類の試薬を用いる方法に応用できるので、汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

---

フロントページの続き

(72)発明者 渡津 吉史

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

<b>(19)【発行国】</b> 日本国特許庁 (J P)	<b>(19)[ISSUINGCOUNTRY]</b> Japan Patent Office (JP)
<b>(12)【公報種別】</b> 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
<b>(11)【公開番号】</b> 特開平 1 1 - 1 5 5 5 9 5	<b>(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER]</b> Unexamined-Japanese-Patent No. 11-155595
<b>(43)【公開日】</b> 平成 1 1 年 ( 1 9 9 9 ) 6 月 1 5 日	<b>(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION]</b> Heisei 11 (1999) June 15
<b>(54)【発明の名称】</b> リポ蛋白質コレステロールの定量方法および試薬キット	<b>(54)[TITLE]</b> The quantitative method and reagent kit of lipoprotein cholesterol
<b>(51)【国際特許分類第 6 版】</b> C12Q 1/32 1/26 1/60 G01N 33/92	<b>(51)[IPC]</b> C12Q 1/32 1/26 1/60 G01N33/92
<b>【F I】</b> C12Q 1/32 1/26 1/60 G01N 33/92            A	<b>[FI]</b> C12Q 1/32 1/26 1/60 G01N33/92            A
<b>【審査請求】</b> 未請求	<b>[EXAMINATIONREQUEST]</b> UNREQUESTED
<b>【請求項の数】</b> 8	<b>[NUMBEROFCLAIMS]</b> 8
<b>【出願形態】</b> O L	<b>[Application form]</b> O L
<b>【全頁数】</b> 1 0	<b>[NUMBEROFPAGES]</b> 10
<b>(21)【出願番号】</b> 特願平 9 - 3 2 5 0 2 3	<b>(21)[APPLICATIONNUMBER]</b> Japanese Patent Application No. 9-325023

(22)【出願日】  
平成9年(1997)11月26日

(22)[DATEOFFILING]  
Heisei 9 (1997) November 26

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】  
000170565

[IDCODE]  
000170565

【氏名又は名称】  
国際試薬株式会社

International Reagents Corp., K.K.

【住所又は居所】  
兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 岸 浩司

Koji Kishi

【住所又は居所】  
神戸市西区室谷1丁目1-2  
国際試薬株式会社研究開発センター内

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 角山 功

Isao Sumiyama

【住所又は居所】  
神戸市西区室谷1丁目1-2  
国際試薬株式会社研究開発センター内

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 白波瀬 泰史

Yasushi Shirahase

【住所又は居所】

[ADDRESS]

神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2  
国際試薬株式会社研究開発セン  
ター内

**(72)【発明者】****(72)[INVENTOR]**

【氏名】 渡津 吉史

Totsu Yoshifumi

**【住所又は居所】****[ADDRESS]**

神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2  
国際試薬株式会社研究開発セン  
ター内

**(74)【代理人】****(74)[PATENTAGENT]****【弁理士】****[PATENTATTORNEY]**

【氏名又は名称】 高島 一

Takashima 1

**(57)【要約】****(57)[SUMMARY]****【解決手段】**

他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定する。その後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定する。吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロール濃度を求める。特に反応液中に濁りを生じない条件下で行う。

**[SOLUTION]**

The cholesterol in another lipoprotein fraction is made to act on at least a cholesterol oxidase. Absorbance is measured. After that, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol dehydrogenase at least. Absorbance is measured. It calculates the cholesterol concentration in a specific lipoprotein fraction from the difference of absorbance. It carries out on the conditions which do not produce turbidity especially in a reaction liquid.

**【効果】**

特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することができる。遠心分画などの分離分画

**[EFFECTS]**

The assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction can be carried out. Since the separation fraction of the centrifugation fraction etc. is unnecessary,

が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法。

**【請求項 2】**

生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、少なくとも生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にリポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させ、且つ当該反応時に凝集物を生じさせないようにすること

operation is simple.

The problem in a measurement error or an artificial factor can be decreased.

The continuous measurement using the autoanalyzer of a general purpose mold is attained, it can multichannelize with another inspection item and can measure.

**【CLAIMS】****【CLAIM 1】**

A quantitative method of the lipoprotein cholesterol, which is the method of carrying out the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that the cholesterol in another lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol oxidase at least.

After measuring absorbance, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol dehydrogenase at least.

Absorbance is measured, the assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is carried out from the difference of both absorbance.

**【CLAIM 2】**

A quantitative method of the lipoprotein cholesterol, which is the method of carrying out the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that the compound which can form the composite body of lipoprotein cholesterol and a water solubility is made to exist at least at the time of a reaction with a biological sample, a cholesterol oxidase, and a cholesterol dehydrogenase.

And it is made not to produce the aggregate at the time of said reaction.

を特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法。

**【請求項 3】**

リポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物が、カリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマーおよび多糖類から選ばれる少なくとも一種である請求項 2 記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法。

**【請求項 4】**

生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、生体試料中のリポ蛋白質の凝集を生じさせない条件下で、他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法。

**【請求項 5】**

特定のリポ蛋白質が、高比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、超低比重リポ蛋白質またはレムナント様リポ蛋白質である請求項 1～4 のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法。

**[CLAIM 3]**

The quantitative method of lipoprotein cholesterol and the lipoprotein cholesterol of Claim 2 whose compound which can form the composite body of a water solubility is at least one kind chosen from calix arenes, calix arene derivatives, a poly anion, a water-soluble polymer, and a polysaccharide.

**[CLAIM 4]**

A quantitative method of the lipoprotein cholesterol, which is the method of carrying out the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that on the conditions which do not produce aggregation of the lipoprotein in a biological sample, the cholesterol in another lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol oxidase at least.

After measuring absorbance, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made act on a cholesterol dehydrogenase at least.

Absorbance is measured, the assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is carried out from the difference of both absorbance.

**[CLAIM 5]**

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol in any one of Claim 1-4 whose specific lipoprotein is a high density lipoprotein, a low density lipoprotein, a ultra-low specific-gravity lipoprotein, or a remnant shape lipoprotein.

**【請求項 6】**

コレステロール脱水素酵素が、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、Thio- $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソニク酸酸化型、またはThio- $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソニク酸酸化型をこれらの還元型に変換する反応を触媒する酵素である請求項 1～5 のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法。

**【請求項 7】**

特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリポ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリポ蛋白質コレステロール測定用試薬キット。

**【請求項 8】**

生体試料中のリポ蛋白質を凝集させずに、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリポ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリポ蛋白質コレステロール測定用試薬キット。

**[CLAIM 6]**

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol in any one of Claim 1-5 which is the enzyme with which a cholesterol dehydrogenase catalyses the reaction which transforms a (beta)- nicotinamide-adenine-dinucleotide oxidation type, a Thio-nicotinamide-adenine-dinucleotide oxidation type, a (beta)- nicotinamide adenine dinucleotide-phosphoric-acid oxidation type, or a Thio-nicotinamide adenine dinucleotide-phosphoric-acid oxidation type into such reduced type.

**[CLAIM 7]**

It is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase.

And it is a reagent kit for carrying out an assay under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that the reagent kit for a lipoprotein cholesterol measurement which makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a constituent element at least.

**[CLAIM 8]**

It is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase, without aggregating the lipoprotein in a biological sample.

And it is a reagent kit for carrying out an assay under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that the reagent kit for a lipoprotein cholesterol measurement which makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a constituent element at least.

## 【発明の詳細な説明】

## [DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【0001】

[0001]

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床診断の分野において、生体試料中のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量する方法、およびこの方法に好適に用いられる試薬キットに関する。

## [TECHNICAL FIELD]

This invention, in the field of clinical diagnosis, is related with the method of carrying out the assay of the cholesterol in the lipoprotein fraction in a biological sample, and the reagent kit used suitable for this method.

【0002】

[0002]

## 【従来の技術】

古くからリポ蛋白質は、超遠心操作により、高比重リポ蛋白質 (HDL, 比重1.063~1.21)、低比重リポ蛋白質 (LDL, 比重1.019~1.063)、超低比重リポ蛋白質 (VLDL, 比重1.006~1.019)、カイロミクロン (CM, 比重<1.006) に分画されている。この分画操作は、超遠心機を必要とする上に、遠心は数日に亘って行わなければならない、多検体を処理することは出来なかった。これに代わりポリエチレングリコールまたはデキストラン硫酸等のポリアニオンに、マグネシウムやカルシウム等の二価カチオンを共存させたり、リンタングステン酸に二価カチオンを共存させた分画剤なる溶液と血清とを混和させてLDL、VLDL、CMを沈澱させ、遠心後の上清に残るHDLのみを分画する方法が主流とな

## [PRIOR ART]

Since old times, lipoprotein is fractionated by a super-centrifugation operation into high density lipoprotein (HDL, specific gravity 1.063-1.21), low density lipoprotein (LDL, specific gravity 1.019-1.063), ultra-low specific-gravity lipoprotein (VLDL, specific gravity 1.006-1.019), and chylomicron (CM, specific-gravity <1.006).

This fraction operation makes an ultra-centrifuge necessary, and centrifugation had to be performed over several days, and many test substances were not able to be processed.

Poly anions, such as polyethyleneglycol or a dextran sulfuric acid, are made to coexist with dihydric positive ions, such as magnesium and calcium, instead of this.

Moreover, the fraction agent which made tungstophosphoric acid coexist with a dihydric positive ion

mixes solution and blood serum

and makes LDL, VLDL, CM precipitate.

The method of fractionating only HDL which remains in the supernatant liquid after centrifugation was in use.

The autoanalyzer which is becoming popular widely in the field of a clinical examination was able to be used for this method.

That is, the measurement of the total



っていた。この方法は、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置を用いることが出来た。即ち、分画したHDL画分中のコレステロールは、酵素法による総コレステロールの測定が自動分析機で確立しているので、それを応用してHDL画分中のコレステロール濃度を求めることが出来た。

#### 【0003】

しかしながら、この方法も低速とは言え遠心操作が必要であり、分画剤と血清とを混和させるときの人為的な定量誤差や検体の取り違いなどが問題となっていた。その上、自動分析装置で他の一般的な生化学項目と同時に測定出来なかった。臨床検査は迅速対応が求められており、この事からも検査時間の短縮が課題となっていた。

#### 【0004】

一方、臨床的には動脈硬化のリスクファクターであるLDL画分中のコレステロール値を重視する報告〔総コレステロールの基準値と設定根拠、動脈硬化、24(6), 260(1996)〕もある。現在LDL画分中のコレステロール値は総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)及びHDL画分中のコレステロールの測定結果から経験的なファクターを代入して求める。その式〔Friedewald WT, et al, Clin. Chem., 18, 499-502(1972)〕を以下に

cholesterol by the enzyme method establishes the cholesterol in the HDL fraction which fractionated by the autoanalyzer.

Therefore, it was able to be applied and the cholesterol concentration in a HDL fraction was able to be calculated.

#### [0003]

However, this method also has necessary centrifugation operation, although it is a low speed.

Assay human error or a test substance mistaking, etc. at the time of making it mix with a fraction agent and a blood serum became a problem.

Moreover, it was not able to measure to another general biochemistry item and simultaneousness with an autoanalyzer.

As for the clinical examination, rapid correspondence is required, shortening of inspection time became a subject also from this thing.

#### [0004]

On the other hand, clinically, there is a report which takes very seriously the cholesterol value in the LDL fraction which is the risk factor of arteriosclerosis [the standard value of the total cholesterol, a setting basis, arteriosclerosis, 24(6), 260(1996)].

The cholesterol value in a present LDL fraction substitutes and calculates an experiential factor from the measurement result of the cholesterol in the total cholesterol (T-CHO), a neutral fat (TG), and a HDL fraction.

The equation [Friedewald WT, et al, Clin.Chem., 18,499-502 (1972)] is shown below.

示す。

**【0005】**

LDL画分中のコレステロール  
 値 = (T-CHO値) - (HDL  
 L画分中のコレステロール値)  
 - (TG値) / 5

**[0005]**

The cholesterol value in a LDL fraction = (T-CHO value) - (cholesterol value in HDL fraction) - (TG value) / 5

**【0006】**

この方法では、測定する3項目が全て正確に測定されなければ成立しない。また、TG値が400mg/dlを越えたり、LDL画分中のコレステロール濃度が100mg/dl以下になると計算値がLDL画分中のコレステロール濃度を反映しなくなると言われている [Warnick GR, et al, Clin. Chem. 36(1), 15-19 (1990), McNamara JR, et al, Clin. Chem. 36(1), 36-42 (1990)]。従って、肝心の異常値が求められない方法である。他に、電気泳動でリポ蛋白を分離し蛋白量を測定する方法やHPLCによるリポ蛋白別コレステロールの測定方法もあるが、検体処理能力に欠ける方法であり、高価な装置も必要となる。

**[0006]**

By this method, if all of three items to measure are not measured by accuracy, it does not establish.

Moreover, TG value exceeds 400 mg/dl.

Moreover, if the cholesterol concentration in a LDL fraction becomes 100 mg/dl or less, it says that a calculated value stops reflecting the cholesterol concentration in a LDL fraction [Warnick GR, et al, Clin. Chem. 36(1), 15-19 (1990), McNamara JR, et al, Clin. Chem. 36(1), 36-42 (1990)].

Therefore, it is the method by which an important abnormal value is not calculated.

There are also the method of separating lipoprotein by the electrophoresis and otherwise, measuring a protein amount and a measuring method of the cholesterol according to lipoprotein by HPLC.

However, it is the method a test-substance capacity is missing.

An expensive apparatus is also needed.

**【0007】**

近年、HDL画分中のコレステロール測定に関して前述した問題を解決するため、全自動のHDL画分中のコレステロールを測定するキットが開発され普及しつつある。特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報及び特開平8-1

**[0007]**

In order to solve the problem mentioned above about the cholesterol measurement in a HDL fraction in recent years, the kit which measures the cholesterol in a fully automatic HDL fraction is developed becoming popular.

The technique looked at by Patent No. 2600065 gazette, Unexamined-Japanese-Patent No. 8-201393 gazette, and Unexamined-Japanese-Patent No. 8-131195 gazette uses a fraction

31195号公報に観られる技術は分画剤を併用するが、分画剤に含まれる二価カチオンとして用いられる金属が自動分析装置で一般的に使用される洗剤により不溶性の沈澱物を形成し、それが廃液機構で蓄積することにより故障の原因となっている。更に反応液中に不溶性の凝集物を形成し、測定結果に影響を与える濁りが生じて測定誤差の原因となっているばかりか、凝集物により反応セルが汚染されて、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与えている。

**【0008】**

普及しているほとんどの自動分析装置は、10分で反応を完了する場合が多い。このとき反応中に濁度変化があつては測定値の正確性に問題がある。その他、反応液が濁ると再現性が低下するという問題も加わる。それ故、測定する検体に制限が加わり、幅広い測定波長と多種多様な患者検体に対応することが出来ない。例えば、340nm付近(UV域)では凝集物による濁りの現象により、吸光度が2~3以上となり分析機の許容範囲をしばしば越えてしまう欠点がある。

**【0009】**

二価カチオンを用いることのない特開平9-96637号公報の技術は、リポ蛋白と凝集する抗血清を含ませる方法であるが、これも難溶性の抗原抗体凝集物を形成するので、反応セル

medicine together.

However, an insoluble precipitate is formed with the detergent which generally uses with an autoanalyzer the metal used as a dihydric positive ion contained in a fraction medicine, it is the cause of a failure when it is accumulated by the waste-liquid mechanism.

Furthermore, the insoluble aggregate is formed into a reaction liquid, it is not only the cause of a measurement error, but the turbidity which affects a measurement result arises and a reaction cell is contaminated by the aggregate, the measurement result of the other biochemistry item measured simultaneously is affected not a little.

**[0008]**

Almost all diffused autoanalyzers finalize a reaction in 10 minutes in many cases.

If turbidity change is in a reaction at this time, a problem is in the accuracy of a measured value. In addition, if a reaction liquid becomes turbid, the problem that reproducibility falls will also be added.

So, a limit cannot join the test substance to measure and it cannot respond to a broad measurement wavelength and various patient test substances.

For example, near 340 nm (UV region), there is a fault which absorbance becomes two to three or more, and often exceeds the tolerance of an analysis machine according to the phenomenon of the turbidity by the aggregate.

**[0009]**

The technique of Unexamined-Japanese-Patent No. 9-96637 gazette which does not use a dihydric positive ion is the method of including lipoprotein and the antiserum to aggregate.

However, this also forms the slightly soluble antigen antibody aggregate.

Therefore, a reaction cell is contaminated.

が汚染される。従って、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与える。また、反応液中の濁りが強度となるので、特にUV領域によるHDL画分中のコレステロール測定に対しても前述と同じ原因で正確な測定が不可能である。高波長域でも濁りの影響で測定値の正確性に欠ける。

**【0010】**

また、このような濁りを最終的に消去する技術である特開平6-242110号公報もあるが、この方法だと最低でも3~4段階の試薬分注操作が必要となり、一般的に普及している生化学項目用の自動分析機は最大二段階のものが主流であるので応用出来ないことが多い。一方、LDL画分中のコレステロールの測定に至っては、現在も計算による方法を採らざるを得ない状況である。

**【0011】**

臨床検査に用いる測定用試薬は、その汎用性を重視するため、緩衝能の維持、安定化、試薬の液状化、防腐効果、短時間測定のため、酵素の活性化等の工夫がなされている。

**【0012】**

コレステロール脱水素酵素 (CDH) を用いるコレステロールの測定には反応時間の短縮を目的としたヒドラジン類の添加が必要となる (特開平5-176797号公報)。しかしながらこ

Therefore, the measurement result of the other biochemistry item measured simultaneously is affected not a little.

Moreover, the turbidity in a reaction liquid becomes strong.

Therefore, an exact measurement cannot be performed by the same cause as the above-mentioned to the cholesterol measurement in the HDL fraction especially by UV range.

The accuracy of a measured value is missing under the influence of turbidity also in a tidal-wave length region.

**[0010]**

Moreover, there is also Unexamined-Japanese-Patent No. 6-242110 gazette which is the technique which finally eliminates such turbidity. However, also at the lowest, three to four steps of reagent dispensing operation is needed in case of this method, since a maximum of two steps of things are in use, the autoanalyzer for biochemistry items which generally is becoming popular cannot be applied in many cases.

On the other hand, if it results in a measurement of the cholesterol in a LDL fraction, it is in the condition which can only take the method by calculation still now.

**[0011]**

In order that the reagent for a measurement used for a clinical examination may take the general purpose very seriously, the device of activation of an enzyme etc. is made for a maintenance of a buffer capacity, stabilization, liquefaction of a reagent, the antisepticizing effect, and the short-time measurement.

**[0012]**

Addition of the hydrazines for shortening of reaction time becomes necessary at a measurement of the cholesterol using a cholesterol dehydrogenase (CDH) (Unexamined-Japanese-Patent No. 5-176797 gazette).

However, by this method, since hydrazines are

の方法では、第一反応でヒドラジン類を存在させるので反応液が高イオン強度下となり、さらに第二反応ではCDHの至適pHである8.0付近、すなわちアルカリ性側に反応液を変動させたり、コレステロール脱水素酵素やコレステロールエステラーゼの活性化剤である界面活性剤を添加すると、可溶性複合体とした目的物質以外のものが分解し、その分解物が本反応に関与し、測定値のばらつきの原因となる。

## 【0013】

HDL画分中のコレステロールを測定する条件において、本反応に関与し易い物質としては、LDL画分中の表面に存在する遊離型コレステロールが挙げられる。これらの分解を抑える方法としては、ポリアニオン、二価金属イオン、水溶性高分子化合物または目的物質以外のものに対する抗体を単独あるいは二種以上を組み合わせで添加し、凝集物あるいは免疫複合体を形成させることにより、本反応への関与を抑えることが可能である。

## 【0014】

しかし、これらの凝集物および免疫複合体による濁りの生成は、CDHを用いた波長340nmにおける紫外測定方法(UV法)では前述の様々な問題も大きな障害となる。

## 【0015】

made to exist at the 1st reaction, a reaction liquid becomes the bottom of high ionic strength.

Furthermore, at a 2nd reaction, reaction liquid is fluctuated to the 8.0 vicinity i.e., alkalinity, which is the optimum pH of CDH.

Moreover, if the surfactant which is an activator of a cholesterol dehydrogenase or a cholesterol esterase is added, things other than the target substance used as the soluble composite body will degrade, the decomposition product participates in this reaction, and it becomes the cause of the unevenness in a measured value.

## [0013]

In the conditions which measure the cholesterol in a HDL fraction, as a material which is easy to participate in this reaction, the liberation mold cholesterol which exists in the surface in a LDL fraction is mentioned.

As a method of restraining these degradations, a poly anion and dihydric metal ion, a water-soluble high molecular compound, or the antibody with respect to things other than a target substance is added combining by itself or 2 or more types, and the participation to this reaction can be restrained by forming the aggregate or an immune complex.

## [0014]

However, generation of the turbidity by these aggregate and immune complexes serves as damage also with the above-mentioned various serious problems by the ultra-violet measuring method (the UV method) in wavelength 340 nm which used CDH.

## [0015]

**【発明が解決しようとする課題】**

このような状況に鑑み、本発明者らは、汎用の自動分析機を用いて遠心操作による分離をせずに、また反応中に濁りを生じさせることなく、生体試料中のHDLやLDLなどのリポ蛋白質の画分中のコレステロールを定量する方法、およびこの方法に好適に用いられる試薬キットについて鋭意研究を行った。

【0016】

**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、予め反応液中で測定誤差となる目的以外のリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール酸化酵素で反応させて分解させた後、次いで目的とするリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素などを用いて測定する方法を見い出した。さらに、本発明者らは、生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にカリクスアレン類およびその誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー、多糖類等のリポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させることにより（即ち添加することにより）、反応液中に濁りを生じることなく、リポ蛋白質画分中のコレステロールの各種分別定量が可能であることを見い出した。

**[PROBLEM ADDRESSED]**

Earnestly research was done about the method of carrying out the assay of the cholesterol in HDL in a biological sample, or the fraction of a LDL etc. lipoprotein, and the reagent kit used suitable for this method, without producing turbidity in a reaction, without carrying out separation according to centrifugation operation in view of such a situation using an autoanalyzer with the general purpose present inventors.

[0016]

**[SOLUTION OF THE INVENTION]**

After the present inventors made the cholesterol in lipoprotein fractions other than the objective used as a measurement error react by the cholesterol oxidase and degraded it in the reaction liquid beforehand, he found out the method of measuring the cholesterol in the lipoprotein fraction then made into the objective using a cholesterol dehydrogenase etc.

Furthermore, the present inventors, at the time of the reaction of a biological sample and a cholesterol oxidase and cholesterol dehydrogenase, calix arenes and their derivatives, by making the compound which can form the water soluble composite body of a lipoprotein cholesterol, such as a poly anion, a water-soluble polymer, and a polysaccharide exist (namely, by adding), it was discovered that the various fractional determinations of the cholesterol in a lipoprotein fraction could be performed without producing turbidity in a reaction liquid,

## 【0017】

すなわち、本発明は、(1)生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法、(2)生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、少なくとも生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にリポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させ、且つ当該反応時に凝集物を生じさせないようにすることを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法、(3)リポ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物が、カリクスアレノ類、カリクスアレノ誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマーおよび多糖類から選ばれる少なくとも一種である上記(2)記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法、(4)生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを他のリポ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、生体試料中のリ

## 【0017】

Namely, this invention is

## (1)

The method of carrying out the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample under coexistence of another lipoprotein fraction, in which the cholesterol in another lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol oxidase at least.

After measuring absorbance, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made to act on a cholesterol dehydrogenase at least.

Absorbance is measured, the assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is carried out from the difference of both absorbance.

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol characterized by the above-mentioned, (2) The method of carrying out the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample under coexistence of another lipoprotein fraction, in which the compound which can form the composite body of lipoprotein cholesterol and a water solubility is made to exist at least at the time of a reaction with a biological sample, a cholesterol oxidase, and a cholesterol dehydrogenase.

And it is made not to produce the aggregate at the time of said reaction.

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol characterized by the above-mentioned, (3)

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol of said (2) description in which lipoprotein cholesterol and water compound which can form a soluble composite body is at least one kind chosen from calix arenes, calix arene derivative, poly anion, water-soluble polymer, and polysaccharide, (4)

The method of carrying out the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that on the conditions which do not produce aggregation of the lipoprotein in a biological sample, the cholesterol in another lipoprotein

ポ蛋白質の凝集を生じさせない条件下で、他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの定量方法、(5)特定のリポ蛋白質が、高比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、超低比重リポ蛋白質またはレムナント様リポ蛋白質である上記(1)～(4)のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法、(6)コレステロール脱水素酵素が、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型、またはThio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型をこれらの還元型に変換する反応を触媒する酵素である上記(1)～(5)のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの定量方法、(7)特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリポ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリポ蛋白質コレステロール測

fraction is made to act on a cholesterol oxidase at least.

After measuring absorbance, the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is made act on a cholesterol dehydrogenase at least.

Absorbance is measured, the assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction is carried out from the difference of both absorbance.

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol characterized by the above-mentioned, (5)

The quantitative method of the lipoprotein cholesterol in any one of said (1)-(4) whose specific lipoprotein is a high density lipoprotein, a low density lipoprotein, a ultra-low specific-gravity lipoprotein, or a remnant shape lipoprotein, (6)

A cholesterol dehydrogenase is a (beta)-nicotinamide-adenine-dinucleotide oxidation type, a Thio-nicotinamide-adenine-dinucleotide oxidation type, and a (beta)- nicotinamide adenine dinucleotide-phosphoric-acid oxidation type, or the quantitative method of the lipoprotein cholesterol in any one of said (1)-(5) which is the enzyme which catalyses the reaction which transforms a Thio-nicotinamide adenine dinucleotide-phosphoric-acid oxidation type into such reduced type, (7)

A reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase.

And it is a reagent kit for carrying out an assay under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that the reagent kit for a lipoprotein cholesterol measurement which makes a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase a constituent element at least, (8) A reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase, without aggregating the lipoprotein in a biological sample.

And it is a reagent kit for carrying out an assay under coexistence of another lipoprotein fraction, comprised such that it is the reagent kit for a lipoprotein cholesterol measurement which makes a cholesterol oxidase and a cholesterol



定用試薬キット、(8)生体試料中のリポ蛋白質を凝集させずに、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリポ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリポ蛋白質コレステロール測定用試薬キットである。

**【0018】**

以下、本発明を実施するための諸条件について詳細に説明するが、本発明は以下の記載により何ら制限されるものではない。

**【0019】**

本発明において生体試料とは、血清や血漿などであり、例えば前述のHDL、LDL、VLDL、CMおよびVLDLやCMがリポ蛋白質リパーゼの作用を受けて生じるレムナント様リポ蛋白質等のリポ蛋白質画分を含むものである。リポ蛋白質は、コレステロールを含む脂質成分とアポ蛋白質とが結合することにより内部に脂質、外向きに蛋白質が存在するものであり、生体中で可溶化している。

**【0020】**

本発明においては、目的とする画分以外のリポ蛋白質画分由来のコレステロールを分解する為に、まず当該コレステロールとコレステロール酸化酵素を作用させることを特徴とする（第一

dehydrogenase a constituent element at least.

**[0018]**

Hereafter, the terms and conditions for implementing this invention are demonstrated in detail.

However, the following description does not limit this invention at all.

**[0019]**

Biological samples are a blood serum, plasma, etc. in this invention.

For example, lipoprotein fractions, such as a remnant shape lipoprotein which HDL, LDL, VLDL, CM, and above-mentioned VLDL and above-mentioned CM receive an effect of a lipoprotein lipase, and produce, are included.

When the lipid component and apoprotein containing cholesterol bond a lipoprotein, a lipid exists in the interior and a protein exists in an outer direction.

It is solubilizing in a biological body.

**[0020]**

In this invention, in order to degrade the cholesterol derived from lipoprotein fractions other than the fraction made into the objective, said cholesterol and cholesterol oxidase are made act first.

It is characterized by the above-mentioned (1st reaction).

反応)。コレステロール酸化酵素としては、コレステロールを酸化することができるものであれば、その由来等には格別の制限はない。第一反応は、pH 6.0～8.5、好ましくはpH 6.5～7.5の範囲で、25～40℃、好ましくは30～37℃、1～10分、好ましくは3～5分間行う。第一反応終了後、当該反応溶液の吸光度を測定する。吸光度測定の場合は、目的とする画分中のコレステロールを測定する際に利用する反応ならびに酵素の種類によっても異なるが、例えば下記第二反応時に使用する補酵素として、コレステロール脱水素酵素を用いて、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の酸化型から還元型への変換を利用する場合は、波長340nm付近での吸光度を測定すればよい。

#### 【0021】

生体試料中の特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素に作用させる第二反応は、pH 7.0～10.0、好ましくはpH 7.5～8.5の範囲で、25～40℃、好ましくは30～37℃、1～10分、好ましくは3～5分間行う。第二反応終了後、第一反応の条件に準じて吸光度を測定する。

#### 【0022】

当該コレステロール脱水素酵素もその由来等については特に制限はなく、コレステロール脱水

As a cholesterol oxidase, if cholesterol can be oxidized, there will be no exceptional limit in the origin.

The 1st reaction is pH6.0-8.5, preferably it is the range of pH6.5-7.5 and is 25-40 degrees-Celsius, preferably they are 30-37 degrees-Celsius, and 1-10 minutes, preferably it carries out for 3 to 5 minutes.

The absorbance of said reaction solution is measured after the 1st reaction completion.

The conditions of an absorbance measurement change also with the reaction utilized when measuring the cholesterol in the fraction made into the objective, and kinds of enzyme.

However, what is sufficient is just to measure the absorbance near wavelength 340 nm, when [ which uses for example at the time of the following 2nd reaction ] it requires as a coenzyme and utilizes the transformation to reduced type from the oxidation type of the (beta)- nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) using a cholesterol dehydrogenase.

#### [0021]

The 2nd reaction which makes the cholesterol in the specific lipoprotein fraction in a biological sample act on a cholesterol dehydrogenase is pH7.0-10.0, preferably it is the range of pH7.5-8.5 and is 25-40 degrees-Celsius, preferably they are 30-37 degrees-Celsius, and 1-10 minutes, preferably it carries out for 3 to 5 minutes.

According to the conditions of the 1st reaction, absorbance is measured after the 2nd reaction completion.

#### [0022]

About the origin, especially a limit does not have said cholesterol dehydrogenase, either, and it should just catalyse a cholesterol

素反応を触媒するものであれば dehydrogenation.  
 よい。

**【0023】**

第二反応においてコレステロール脱水素酵素を用いる際の補酵素には、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (NAD)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (t-NAD)、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸酸化型 (NADP)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸酸化型 (t-NADP) 等が挙げられる。

**【0024】**

第一反応における pH 6.0 ~ 8.5 を第二反応で pH 7.5 以上、好ましくは pH 8.0 以上にする事で、第一反応に使用したコレステロール酸化酵素は反応に至適な pH 条件から外れる。コレステロール脱水素酵素は pH 8.0 以上に至適 pH を有する為、第二反応で効果的に作用する。この pH 条件の差により、目的となる特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールの定量が可能となるが、コレステロール酸化酵素に対する特異的な阻害物質である HLB 17 以上の非イオン界面活性剤もしくはイオン性界面活性剤、またはフッ化ナトリウム等を第二反応で添加してもよい。

**【0025】**

本発明においては、生体試料と当該酵素の反応の際、凝集物が

**[0023]**

A (beta)- nicotinamide-adenine-dinucleotide oxidation type (NAD), a Thio-nicotinamide-adenine-dinucleotide oxidation type (t-NAD), a (beta)- nicotinamide adenine dinucleotide-phosphoric-acid oxidation type (NADP), a Thio-nicotinamide adenine dinucleotide-phosphoric-acid oxidation type (t-NADP), etc. are mentioned to the coenzyme at the time of using a cholesterol dehydrogenase in a 2nd reaction.

**[0024]**

It is pH6.0-8.5 in the 1st reaction by the 2nd reaction, More than pH7.5

It is carrying out preferably more than pH8.0, and the cholesterol oxidase which used for the 1st reaction removes from optimum pH conditions for a reaction.

Since a cholesterol dehydrogenase has an optimum pH more than pH8.0, it acts effectively at a 2nd reaction.

Although the assay of the cholesterol in the specific lipoprotein fraction used as the objective can be made according to the difference of this pH condition, a non-ion surfactant of 17 or more HLBs which is the specific inhibitor with respect to a cholesterol oxidase, an ionic surfactant, or sodium fluoride may be added at a 2nd reaction.

**[0025]**

In this invention, the aggregate arises in the case of the reaction of a biological sample and

生じ、反応液が濁るのを防ぐ為に、カリクスアレン類およびカリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー、多糖類等の化合物が添加される。これらの化合物は、リポ蛋白質表面とイオン結合または、リポ蛋白質表面の蛋白糖鎖を認識した配位結合により、複合体を形成するが凝集は起こさない。即ち、これらの複合体は、反応溶液中に濁りを生じない可溶性の複合体である。これらの化合物は主にLDL及びVLDL画分と可溶性複合体を形成し、リポ蛋白質中の成分が遊離するのを抑制する。

#### 【0026】

これらの化合物は、金属イオンをある程度の濃度添加することにより凝集がおこり測定困難となるので、本発明においては金属イオンを添加しないか、当該金属イオンの濃度を凝集をおこさせないように設定する必要がある。金属イオンを添加する場合は約1 mMを超えない程度に抑えるが、通常は金属イオンは添加しないことが好ましい。

#### 【0027】

カリクスアレン類は、フェノールを基本骨格とし、フェノールの4～8分子をメチレン基で環状に重合させた環状オリゴマーである。これらのカリクスアレン類に水溶性（親水性）基を導入したカリクスアレン誘導体も開発されている。カリクスアレン類およびその誘導体としては、カリクス（4）アレン〔C

said enzyme, and in order to prevent a reaction liquid becoming turbid, compounds, such as calix arenes and the calix arene derivative, a poly anion, a water-soluble polymer, and a polysaccharide, are added.

By the coordinate bond these compounds have recognized a lipoprotein surface, ionic bond, or the protein sugar chain on the surface of a lipoprotein to be, although a composite body is formed, aggregation is not caused.

That is, these composite bodies are soluble composite bodies which do not produce turbidity in a reaction solution.

These compounds mainly form LDL and a VLDL fraction, and a soluble composite body, it suppresses that the component in a lipoprotein extricates.

#### [0026]

These compounds, by carrying out concentration of a metal ion to some extent, aggregation starts and measuring becomes difficult.

Therefore, it is not necessary to add a metal ion in this invention, and it is necessary to set up concentration of said metal ion so that aggregation may not be caused.

When adding a metal ion, it restrains to the grade which does not exceed about 1 mM.

However, as for a metal ion, not adding is usually desirable.

#### [0027]

Calix arenes make a phenol a basic skeleton, it is the cyclic oligomer which polymerized four to 8 molecule of a phenol annularly by the methylene group.

The calix arene derivative which transduced the water-soluble (hydrophilic) group into these calix arenes is also developed.

As calix arene and its derivative, calix (4) arene, calix (6) arene, calix (8) arene, sulfuric-acid calix (4) arene, sulfuric-acid calix (6) arene, sulfuric-acid calix (8) arene, acetic-acid calix (4)

alix (4) arene]、カリクス (6) アレン、カリクス (8) アレン、硫酸カリクス (4) アレン、硫酸カリクス (6) アレン、硫酸カリクス (8) アレン、酢酸カリクス (4) アレン、酢酸カリクス (6) アレン、酢酸カリクス (8) アレン、カルボキシカリクス (4) アレン、カルボキシカリクス (6) アレン、カルボキシカリクス (8) アレン、カリクス (4) アレンアミン、カリクス (6) アレンアミン、カリクス (8) アレンアミンなどが挙げられるが、使用に際しては特に制限されない。製品化に成功している硫酸カリクスアレンが水溶性に優れ取扱いが容易である。カリクスアレン類またはその誘導体をコレステロール測定に応用する場合、コレステロールを酵素的に測定する条件下に、反応液中に  $0.05 \sim 50 \text{ mmol/L}$ 、好ましくは  $0.1 \sim 10 \text{ mmol/L}$  となるように添加すればよい。カリクスアレン類およびその誘導体は、1種または2種以上を用いることができ、2種以上用いる場合の各カリクスアレン類およびその誘導体の量は上述の範囲内で適宜変更し得る。

#### 【0028】

ポリアニオンとしては、デキストラン硫酸、リンタングステン酸、ヘパリンなどのナトリウム塩やカリウム塩が挙げられ、反応液中に  $0.01 \sim 1.0 \text{ w/v\%}$ 、好ましくは  $0.05 \sim 0.2 \text{ w/v\%}$  となるように添加す

arene, acetic-acid calix (6) arene, acetic-acid calix (8) arene, carboxy calix (4) arene, carboxy calix (6) arene, carboxy calix (8) arene, calix (4) arene amine, calix (6) arene amine, calix (8) arene amine, etc. are mentioned.

However, it does not limit especially on the occasion of use.

The potassium-sulfate Cinnamomum-camphora arene which succeeds in making into a product has excellent water-solubility and handling is easy.

It is  $0.05 \sim 50 \text{ mmol/L}$  in a reaction liquid to the conditions which measure cholesterol enzymatically when applying calix arenes or its derivative to a cholesterol measurement, what is sufficient is just to add so that it may preferably become  $0.1 \sim 10 \text{ mmol/L}$ .

Calix arenes and their derivatives

can use 1 type or 2 or more types, the amount of each of the calix arenes and their derivatives in the case of using two or more sorts can be altered suitably to within the above-mentioned range.

#### [0028]

As a poly anion, sodium salts and potassium salts, such as a dextran sulfuric acid, tungstophosphoric acid, and a heparin, are mentioned, it is  $0.01$  to  $1.0 \text{ w/v\%}$  in a reaction liquid, what is sufficient is just to add so that it may preferably become  $0.05$  to  $0.2 \text{ w/v\%}$ .

ればよい。

**【0029】**

水溶性ポリマーには、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリエチレングリコール等が挙げられ、反応液中に0.01～5.0 w/v%、好ましくは0.05～0.2 w/v%となるように添加すればよい。

**【0030】**

多糖類には、レクチン（コンカナバリンA、ヒマメレクチン等）、 $\lambda$ -カラギーナン、 $\kappa$ -カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、Apo-B抗血清、シクロデキストリン類が挙げられ、反応液中に0.01～2.0 w/v%、好ましくは0.05～0.5 w/v%となるように添加すればよい。

**【0031】**

シクロデキストリン（CD）類は、本発明の目的が達成できるものであればいずれも好適に使用できるが、とりわけ部分ヒドロキシプロピル化 $\alpha$ -CD、部分ヒドロキシプロピル化 $\beta$ -CD、部分メチル化 $\alpha$ -CD、部分メチル化 $\beta$ -CD、部分ポリマー化 $\beta$ -CD等が好ましい。これらCD類は、単独または組み合わせて用いられる。部分ヒドロキシプロピル化とは、 $\alpha$ または $\beta$ -CDを構成する6または7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基において、2位および/または6位の水酸基の水素原子がヒドロ

**[0029]**

A polyacrylamide, a polyacrylic acid, a polymethacrylic acid, polyethyleneglycol, etc. are mentioned to a water-soluble polymer, it is 0.01 to 5.0 w/v% in a reaction liquid, what is sufficient is just to add so that it may preferably become 0.05 to 0.2 w/v%.

**[0030]**

Lectins (concanavalin A, Ricinus communis beans lectin, etc.), ( $\lambda$ )-carrageenan, ( $\kappa$ )-carrageenan, sodium alginate, Apo-B antiserum, and cyclodextrins are mentioned for a polysaccharide, what is sufficient is just to add into the reaction liquid so that it may become 0.01 to 2.0 w/v%, preferably 0.05 to 0.5 w/v%.

**[0031]**

If cyclodextrins (CD) can attain objective of the invention, it can use all suitably.

However, partial hydroxypropylated ( $\alpha$ )-CD, partial hydroxypropylated ( $\beta$ )-CD, partial methylation ( $\alpha$ )-CD, partial methylation ( $\beta$ )-CD, partial polymerization ( $\beta$ )-CD, etc. are desirable especially.

These CDs are used individually or in combination.

It sets to at least 1 glucose residue among the glucose residues of 6 or 7 which constitutes partial hydroxypropylation or ( $\alpha$ ) ( $\beta$ )-CD, it says that the hydrogen atom of the hydroxyl group of 2-position and/or 6-position is substituted by the hydroxy-propyl group [for example, 2-hydroxy-propyl group "-O-CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>"].

Moreover, it sets to at least 1 glucose residue among the glucose residues of 6 or 7 which

キシプロピル基〔例えば2-ヒドロキシプロピル基「 $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ 」〕に置換されていることをいう。また、部分メチル化とは、 $\alpha$ または $\beta$ -CDを構成する6または7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基において、2位および/または6位の水酸基の水素原子がメチル基に置換されていることをいう。さらに、部分ポリマー化とは、一の $\beta$ -CDを構成する7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基において、2位、3位および6位の水酸基のうち少なくとも一の水酸基が、他の $\beta$ -CDを構成するグルコース残基の2位、3位および6位の水酸基のうち少なくとも一の水酸基に、架橋剤によって相互に架橋され、複数の $\beta$ -CD分子がポリマーを形成することをいう。

**【0032】**

LDL画分等と可溶性複合体を形成するこれらの化合物群は、目的に応じて組み合わせて使用するとさらに効果的である。

**【0033】**

次に各画分中のコレステロールの定量について説明する。HDL画分中のコレステロールを定量する場合、第一反応でHDL画分以外のリポ蛋白質画分、特にLDL画分中の遊離型コレステロールが塩濃度やpHの関係で遊離し易くなる。LDLの分解を抑える方法として、可溶性複合体を形成するカリクスアレ

constitutes partial methylation or (alpha) (beta)-CD, it says that the hydrogen atom of the hydroxyl group of 2-position and/or 6-position is substituted by the methyl group.

Furthermore, with a partial polymerization, it sets to at least 1 glucose residue among the glucose residues of 7 which constitutes one (beta)-CD, a bridge is mutually cross-linked by the at least 1 hydroxyl group by the crosslinker among the hydroxyl groups of 2-position of the glucose residue from which an at least 1 hydroxyl group constitutes other (beta)-CD among the hydroxyl groups of 2-position, 3-position, 6-position, 3-position, 6-position, it says that some (beta)-CD molecules form a polymer.

**[0032]**

If these compound groups that form a LDL fraction etc. and a soluble composite body are combined and used according to the objective, they are further effective.

**[0033]**

Next, the assay of the cholesterol in each fraction is demonstrated.

When carrying out the assay of the cholesterol in a HDL fraction, the liberation mold cholesterol in lipoprotein fractions other than a HDL fraction, especially a LDL fraction becomes easy to extricate by the relationship between a salt concentration or pH at the 1st reaction.

As a method of restraining a degradation of LDL, addition of calix arenes which forms a soluble composite body, the calix arene

ン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー（水溶性高分子化合物）、多糖類の添加が挙げられる。しかしながら、測定対象となる生体試料には多種多様なリポ蛋白質が存在するため、コレステロールの遊離を完全に抑制することは難しい。従って好ましくは、当該遊離型コレステロールをコレステロール酸化酵素による第一反応にて分解させ、第二反応でHDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポ蛋白質リパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール脱水素酵素の反応にて定量する方法が併用される。

#### 【0034】

可溶性複合体を形成するために用いられるカリクスアレン類等の化合物の添加量は前述のとおりである。

#### 【0035】

LDL画分中のコレステロールを定量する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、即ちpH6.0～8.0程度、イオン強度200～500mmol/L程度の条件下で、第一反応でLDLと可溶性複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL画分およびVLDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポ蛋白質リパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール酸化酵素を作用させる。残ったLDL画分を第二反応にて塩濃度を高めたり界面活性剤を添加したりして分解

derivative, a poly anion, a water-soluble polymer (water-soluble high molecular compound), and a polysaccharide is mentioned. However, since various lipoproteins exist in the biological sample used as the measuring object, it is difficult to suppress liberation of cholesterol completely.

Therefore, preferably said liberation mold cholesterol is degraded at the 1st reaction by the cholesterol oxidase.

The method of carrying out the assay of the cholesterol in a HDL fraction at the reaction of a cholesterol dehydrogenase under coexistence of the lipoprotein lipase or a cholesterol hydrolase as required is used together at a 2nd reaction.

#### 【0034】

The additional amount of compounds, such as calix arenes used in order to form a soluble composite body, is as above-mentioned.

#### 【0035】

When carrying out the assay of the cholesterol in a LDL fraction, the conditions described previously are combined, that is, while forming LDL and a soluble composite body and making it stabilize by the 1st reaction on the conditions of about pH6.0-8.0 and about 200 to 500 mmol/L of ionic strength, a cholesterol oxidase is made to act for the cholesterol in a HDL fraction and a VLDL fraction under coexistence of the lipoprotein lipase or a cholesterol hydrolase as required.

A salt concentration is raised for the LDL fraction which remained at a 2nd reaction, or a surfactant is added, and it degrades, the assay of the cholesterol in a LDL fraction is carried out at the reaction of a cholesterol dehydrogenase under coexistence of the lipoprotein lipase or a cholesterol hydrolase as required.



し、LDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポプロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール脱水素酵素の反応にて定量する。第一反応時において、LDLと可溶性複合体を形成する化合物は、その種類の組み合わせと濃度を適宜調整して用いることができる。

**【0036】**

VLDL画分中のコレステロールを定量する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、即ちpH 6.5～8.5程度、イオン強度300～600 mmol/L程度の条件下で、第一反応でVLDL画分と可溶性複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL画分およびLDL画分中のコレステロールを分解する。第一反応時において、VLDLと可溶性複合体を形成する化合物は、その種類の組み合わせと濃度を適宜調整して用いることができる。第二反応でVLDLの可溶性複合体を分解させる手段としては、第二反応における酵素反応を妨害しなければ何等制限されず、界面活性剤、コール酸類や酵素を用いるか、塩濃度等を適宜調整すればよい。

**【0037】**

特定のリポ蛋白質画分中のコレステロール濃度は、第一反応および第二反応における吸光度をそれぞれ測定し、その吸光度の差引により求められる。例えば、HDL画分中のコレステロールを定量する場合、HDL画分以

In the time of the 1st reaction, the compound which forms LDL and a soluble composite body can adjust the kind of combination and concentration suitably, and can be used.

**[0036]**

When carrying out the assay of the cholesterol in a VLDL fraction, the conditions described previously are combined.

That is, while forming a VLDL fraction and a soluble composite body and making it stabilize by the 1st reaction on the conditions of about pH6.5-8.5 and about 300 to 600 mmol/L of ionic strength, the cholesterol in a HDL fraction and a LDL fraction is degraded.

In the time of the 1st reaction, the compound which forms VLDL and a soluble composite body can adjust the kind of combination and concentration suitably, and can be used.

As means into which the soluble composite body of VLDL is disassembled at a 2nd reaction, if the enzyme reaction in a 2nd reaction is not disturbed, it does not limit at all, and what is sufficient is just to adjust a salt concentration etc. suitably, using a surfactant, and cholic acids and an enzyme.

**[0037]**

The cholesterol concentration in a specific lipoprotein fraction measures the absorbance in the 1st reaction and a 2nd reaction, respectively, the total of the absorbance calculates.

For example, when carrying out the assay of the cholesterol in a HDL fraction, after measuring the absorbance in the state where the

外のリポ蛋白質画分のコレステロールを第一反応で分解させた状態での吸光度を測定した後、第二反応での吸光度を測定することにより、第一反応で未反応のHDL画分中のコレステロールを定量することができる。

**【0038】**

当該定量方法は、上述のHDL画分、LDL画分およびVLDL画分のみならず、レムナント様リポ蛋白質画分等の他のリポ蛋白質画分にも応用ができる。

**【0039】**

本発明の定量方法は、本発明の試薬キットによって好適に実施され得る。本発明の試薬キットは、好ましくは第一反応においてコレステロール酸化酵素が少なくとも反応液中に存在するように、第二反応においてコレステロール脱水素酵素が少なくとも反応液中に存在するように配合されたものである。試薬の形態は、乾燥状、液状など特に限定されるものではない。試薬キット中には、酵素の活性化剤などが配合されていてもよく、また試薬キットが、例えば第一反応用試薬と第二反応用試薬との組合せのように、反応液中に添加する時期が異なる複数の種類の試薬を組み合わせたものであってもよい。

**【0040】**

本発明の試薬キットは、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キッ

cholesterol of lipoprotein fractions other than a HDL fraction was degraded at the 1st reaction, the assay of the cholesterol in a unreacted HDL fraction can be carried out at the 1st reaction by measuring the absorbance in a 2nd reaction.

**[0038]**

Application of said quantitative method is possible not only for the HDL fraction, LDL fraction, and VLDL fraction of above-mentioning but other lipoprotein fractions, such as a remnant shape lipoprotein fraction.

**[0039]**

The quantitative method of this invention may be suitably enforced with the reagent kit of this invention.

The reagent kit of this invention was compounded so that a cholesterol oxidase might preferably exist in a reaction liquid at least in the 1st reaction, and a cholesterol dehydrogenase might exist in a reaction liquid at least in a 2nd reaction.

The form of a reagent is not especially limited to dry-form or liquid.

In the inside of a reagent kit, the activator of an enzyme etc. may be compounded.

Moreover, for example, like the combination of the reagent for the 1st reaction and the reagent for the 2nd reaction, the stage when a reagent kit adds in a reaction liquid differs, and what combined the reagent of several kinds may be used.

**[0040]**

The reagent kit of this invention is a reagent kit for measuring the cholesterol in a specific lipoprotein fraction by the cholesterol dehydrogenase.

A cholesterol oxidase and a cholesterol

トであり、コレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有し、その他の成分として、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量するために用いられる酵素等の試薬を含有するように適宜調製される。例えば、HDL画分やLDL画分中のコレステロールは、総コレステロールを測定する方法により測定される。この際の試薬キットには、コレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素に加えて、リポプロテインリパーゼ、コレステロールエステラーゼ等の酵素、コレステロールを定量する反応を完成させるための条件下で添加する活性化剤、安定化剤、補酵素等が適宜選択され、試薬キット中に配合され得る。本発明のキットに含められるコレステロール脱水素酵素としては前述の如く、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存性コレステロール脱水素酵素、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート依存性コレステロール脱水素酵素等が例示される。

【0041】

**【実施例】**

以下、本発明をより詳細に説明するために、HDL画分、LDL画分及びVLDL画分中の各コレステロールの定量例について記すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

dehydrogenase are contained, it is suitably prepared so that reagents, such as an enzyme used in order to carry out the assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction as another component, may be contained.

For example, the cholesterol in a HDL fraction or a LDL fraction is measured by the method of measuring the total cholesterol.

The activator added the condition for completing the reaction which carries out the assay of enzymes, such as lipoprotein lipase and a cholesterol esterase, and the cholesterol in addition to a cholesterol oxidase and a cholesterol dehydrogenase, a stabilizer, a coenzyme, etc. are suitably chosen as the reagent kit in this case, it may compound into a reagent kit.

As a cholesterol dehydrogenase included in the kit of this invention, it illustrates a nicotinamide-adenine-dinucleotide dependent cholesterol dehydrogenase, a nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate dependent cholesterol dehydrogenase, etc. as mentioned above.

【0041】

**[Example]**

Hereafter, in order to demonstrate this invention to a detail more, it describes about the example of an assay of each cholesterol in a HDL fraction, a LDL fraction, and a VLDL fraction. However, this invention is not limited to these.

【0042】

[0042]

## 【実施例1】

## 濁度の確認結果

緩衝液に表1に示す化合物を添加し、試薬とした。検体は、超遠心（100,000G）操作で得たVLDL、LDL、HDL画分と正常なヒト血清および乳び検体を用いた。測定は、検体5 $\mu$ lに試薬180 $\mu$ lを加え37℃で5分間インキュベートし、この時点で主波長340nmの吸光度と濁りの確認を行った。対照法として市販されているキット、デタミナーL HDL-C（協和メデックス（株）社製）、コレステストHDL（第一化学薬品工業（株）社製）、HDL-Cダイレクトワコー（和光純薬（株）社製）の第一試薬を用いた。また、特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報、特開平9-96637号公報の各公報に記載の実施例を参考にした試薬も調製した。操作はキットに添付されている取り扱い説明書及び各公報記載の実施例に従った。結果を表1に示す。本発明において用いられる化合物を添加した試薬では、濁りが生じていないことがわかる。

【0043】

## [Example 1]

## The confirmation result of turbidity

The compound shown to Table 1 to buffer is added, it considered as the reagent.

VLDL and LDL which were obtained by super-centrifugation (100,000G) operation, the HDL fraction, the normal human blood serum, and the chyle test substance were used for the test substance.

A measurement adds reagent 180 microliter to test-substance 5 microliter, and incubates it for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, turbidity was confirmed with absorbance with a dominant wavelength of 340 nm at the point.

The kit marketed as a contrasting method, DataMina -L HDL-C (Kyowa Medex make), Cholestest HDL (Daiichi Pure Chemicals Industrial company make), and the 1st reagent of a HDL-C direct Wako (Wako-Purechemical company make) were used.

Moreover, the reagent modeled after the Example as described in each gazette of Patent No. 2600065 gazette, Unexamined-Japanese-Patent No. 8-201393 gazette, and Unexamined-Japanese-Patent No. 9-96637 gazette was also prepared.

Operation followed the Example of the operation manual attached to the kit, and each gazette description.

A result is shown to Table 1.

With the reagent which added the compound used in this invention, it finds that turbidity does not arise.

[0043]

【表1】

[Table 1]

化 合 物 名 (濃 度)	検 体				
	VLDL	LDL	HDL	血清	乳び血清
硫酸カリクス(4)アレ (1mmol/L)	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.000
硫酸カリクス(6)アレ (1mmol/L)	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.005	— 0.000
硫酸カリクス(8)アレ (1mmol/L)	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.005	— 0.000
デキストラン硫酸ナトリ (0.1%)	— 0.001	— 0.003	— 0.000	— 0.004	— 0.002
リンタングステン酸ナトリ (0.1%)	— 0.027	— 0.099	— 0.036	— 0.000	— 0.043
ポリアクリル酸 (0.1%)	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.003
λ-カラギーナン (0.1%)	— 0.000	— 0.000	— 0.002	— 0.009	— 0.003
Apo-B 抗血清 (0.24mg/ml Becker titer)	— 0.051	— 0.065	— 0.003	— 0.076	— 0.069
コンカナバリンA (0.05%)	— 0.003	— 0.011	— 0.001	— 0.009	— 0.002
HP-γ-CD (0.1%)	— 0.003	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.003
DM-β-CD (0.1%)	— 0.013	— 0.000	— 0.000	— 0.008	— 0.002
ヘパリンナトリウム (0.1%)	— 0.001	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.000
アルギン酸ナトリウム (0.1%)	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.003	— 0.000
PEG 2000 (0.1%)	— 0.001	— 0.002	— 0.000	— 0.000	— 0.000
PEG 4000 (0.1%)	— 0.008	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.005
PEG 6000 (0.1%)	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.000	— 0.000
市販キット	デタミナーL HDL-C	++ 0.106	+++ 1.060	— 0.006	++ 0.186
	コレステスト HDL	++ 0.241	+++ 1.341	— 0.004	+++ 0.565
	HDL-C ダイレ クトワコー	++ 0.216	++ 0.487	— 0.013	+++ 0.596
特許第2600065 号公報	++ 0.161	++ 0.831	— 0.000	+++ 1.913	+++ 3.220
特開平8-201393号公報	— 0.026	++ 0.101	— 0.099	++ 0.354	+++ 2.093
特開平9-96637 号公報	++ 0.522	+++ 2.604	— 0.045	+++ 1.008	++ 0.874

Top row (left to right): Compound Name (Concentration), Test Substance (VLDL, LDL, HDL, Blood serum, Chyle blood serum)

Left column (top to bottom):  
 Sulfuric-acid calix (4) arene,  
 Sulfuric-acid calix (6) arene,  
 Sulfuric-acid calix (8) arene (1 mmol/L),  
 Dextran sulfate sodium (0.1%),  
 Phosphotungstic acid sodium (0.1%),

Polyacrylic acid (0.1%),  
 gamma- carrageenan (0.1%),  
 Apo-B antiserum (0.24 mg/ml Becker titer),  
 oncanavalin A (0.05%),  
 HP-gamma-CD (0.1%),  
 DM-beta-CD (0.1%),  
 Heparin sodium (0.1%),  
 Sodium alginate (0.1%),  
 PEG200 (0.1%),  
 PEG4000 (0.1%),  
 PEG6000 (0.1%),  
 Commercial kit (DataMina- L HDL-C, Cholestest HDL, HDL-C direct Wako),  
 Patent No. 2600065 gazette,  
 Patent No. 8-201393 gazette,  
 Patent No. 9-96637 gazette

**【0044】**

注1) 各化合物の上段：濁度の強度を示す。下段：340nmにおける検体自身の吸光度を差し引いた複合体形成による吸光度の変化を示す。

**[0044]**

note 1) The upper stage of each compound : showing the intensity of turbidity.  
 Lower stage: Showing change of the absorbance by the composite-body formation which deducted absorbance of a test substance in 340 nm.

**【0045】**

注2) 表中の記号は、以下の濁度を示す。－：濁らない、＋：低度の濁り、++：中度の濁り、+++：高度の濁り、++++：強度の濁り（吸光度2.0以上）

**[0045]**

note 2) The symbol of front Naka shows the following turbidity.  
 - : do not becoming turbid,  
 + : turbidity of the degree of low,  
 ++ : turbidity of the degree of inside,  
 +++ : high degree turbidity,  
 + +++ : turbidity of an intensity (2.0 or more absorbance)

**【0046】**

注3) 表中のHP- $\gamma$ -CDは2-ヒドロキシプロピル- $\gamma$ -シクロデキストリンを、DM- $\beta$ -CDは $\beta$ -CDを構成するグルコース残基の2位および6

**[0046]**

note 3) The hydrogen atom of the hydroxyl group of 2-position of the glucose residue from which HP-(gamma)-CD of front Naka constitutes a 2-hydroxy-propyl-(gamma)-cyclodextrin, and DM-(beta)-CD constitutes (beta)-CD, and 6-position shows the (gamma)-

位の水酸基の水素原子がそれぞれメチル基に置換されているγ-シクロデキストリンを示し、PEGはポリエチレングリコールを示す。

cyclodextrin substituted by the methyl group, respectively, pEG shows polyethyleneglycol.

## 【0047】

## [0047]

## 【実施例2】

HDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1-A、試薬1-Bおよび試薬2を調製し、HDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体5μlに試薬1-Aまたは試薬1-Bを180μl加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

## [Example 2]

The assay of the cholesterol in a HDL fraction  
The following reagent 1-A, reagent 1-B, and a reagent 2 are prepared, hDL-cholesterol concentration was measured.

Ten blood serums of the general public were used for the test substance.

The measurement was implemented with the Hitachi 7170 mold autoanalyzer.

First, the operating method adds reagent 1-A or reagent 1-B to test-substance 5 microliter 180 microliters, and it carries out a constant temperature for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, absorbance 1 was measured at the point by the dominant wavelength of 340 nm, and 570 nm of complementary-wave length.

## 【0048】

さらに、試薬2を60μl加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度2を測定した。

## [0048]

Furthermore, a reagent 2 is added 60 microliters and a constant temperature is carried out for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, absorbance 2 was measured at the point by the dominant wavelength of 340 nm, and 570 nm of complementary-wave length.

## 【0049】

吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のHDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法としてポリエチレングリコール(PG)法を用いた。PG法は国際試薬(株)製PGポールを使用した。また、遠心後の上清のコレステロール濃度

## [0049]

The difference of absorbance 1 and absorbance 2 was calculated and the value of a test substance was converted by making control of known HDL-cholesterol concentration into a standard solution.

As a contrasting method the polyethyleneglycol (PG) method was used.

The PG method used PG pole by International Reagents Corp.

Moreover, the cholesterol concentration of the

は、国際試薬（株）製T-CHO  
O試薬・Aを用いて求めた。測  
定結果として対照法との比較を  
表2に示した。コレステロール  
酸化酵素が添加されていない試  
薬1-Aでは、対照法に比べて  
高値を示すが、コレステロール  
酸化酵素が添加された試薬1-B  
では、対照法の結果とよく一  
致した良好な結果となった。

supernatant liquid after centrifugation was  
calculated using T-CHO reagent\*A by  
International Reagents Corp.

The comparison with the contrasting method  
was shown in Table 2 as a measurement result.  
In reagent 1-A by which the cholesterol oxidase  
is not added, a high value is shown compared  
with the contrasting method.

However, in reagent 1-B by which the  
cholesterol oxidase was added, it became the  
result of the contrasting method, and the  
favorable result which was well in agreement.

## 【0050】

試薬1-Aの調製

緩 衝 液  
pH6.5  
二塩化ヒドラジニウム  
80 mmol/L  
硫酸カリクス（6）アレン  
1.0 mmol/L  
 $\beta$ -ニコチンアミドアデニ  
ンジヌクレオチド酸化型 [NAD]  
D]

5.0 mmol/L

## 【0051】

試薬1-Bの調製

緩 衝 液  
pH6.5  
二塩化ヒドラジニウム  
80 mmol/L  
硫酸カリクス（6）アレン  
1.0 mmol/L  
 $\beta$ -ニコチンアミドアデニ  
ンジヌクレオチド酸化型 [NAD]  
D]

5.0 mmol/L

コレステロール酸化酵素  
10 U/ml

## [0050]

Manufacture of reagent 1-A

Buffer  
pH6.5  
Dichloride hydrazinium  
80 mmol/L  
Potassium-sulfate Cinnamomum-camphora (6)  
arene 1.0 mmol/L  
(beta)- nicotinamide-adenine-dinucleotide  
oxidation type [NAD]  
5.0 mmol/L

## [0051]

Manufacture of reagent 1-B

Buffer  
pH6.5  
Dichloride hydrazinium  
80 mmol/L  
Potassium-sulfate Cinnamomum-camphora (6)  
arene 1.0 mmol/L  
(beta)- nicotinamide-adenine-dinucleotide  
oxidation type [NAD]  
5.0 mmol/L  
Cholesterol oxidase 10  
U/ml



## 【0052】

試薬2の調製

緩 衝 液  
 pH 8.5  
 コレステロール脱水素酵素  
 20 U/ml  
 コレステロール加水分解酵  
 素 6 U/  
 ml

## [0052]

Manufacture of a reagent 2

Buffer  
 pH8.5  
 Cholesterol dehydrogenase  
 20 U/ml  
 Cholesterol hydrolase  
 U/ml 6

## 【0053】

## [0053]

## 【表2】

## [Table 2]

単位: mg/dl

検体	対 照 法	試薬1-A	試薬1-B
1	46.7	54.1	47.3
2	33.1	40.7	32.2
3	52.4	62.3	56.0
4	27.0	41.1	32.5
5	40.0	49.2	42.7
6	31.4	38.9	32.1
7	70.4	76.4	70.0
8	84.5	93.2	84.2
9	29.5	43.4	36.6
10	57.5	63.3	58.8

unit: mg/dL

Left to right: Test substance, the contrasting method,  
 Reagent 1-A, Reagent 1-B

## 【0054】

## [0054]

## 【実施例3】

LDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1および試薬2を調製し、LDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般

## [Example 3]

The assay of the cholesterol in a LDL fraction  
 The following reagents 1 and reagents 2 are prepared, IDL-cholesterol concentration was measured.

Ten blood serums of the man in the street were used for the test substance.

人の血清 10 例を用いた。測定は、日立 7170 型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体 3  $\mu$  l に試薬 1 を 210  $\mu$  l 加え 37  $^{\circ}$ C で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm および副波長 570 nm で吸光度 1 を測定した。

## 【0055】

さらに、試薬 2 を 70  $\mu$  l 加え 37  $^{\circ}$ C で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm および副波長 570 nm で吸光度 2 を測定した。

## 【0056】

吸光度 1 と吸光度 2 の差を求めて、既知の LDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法では、フリーデワルド式により LDL-コレステロール濃度を求めた。HDL コレステロール値は、国際試薬 (株) 製 PG ポールを使用した。総コレステロール値は、国際試薬 (株) 製 T-CHO 試薬・A を用いて求めた。TG 値は、国際試薬 (株) 製 TG 試薬・A を用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表 3 に示した。本法は、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

## 【0057】

試薬 1 の調製

緩 衝 液  
pH 7.0  
硫酸カリクス (6) アレン  
1.0 mmol/L

The measurement was implemented with the Hitachi 7170 mold autoanalyzer.

First, the operating method adds a reagent 1 to test-substance 3 microliter 210 microliters, and it carries out a constant temperature for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, absorbance 1 was measured at the point by the dominant wavelength of 340 nm, and 570 nm of complementary-wave length.

## 【0055】

Furthermore, a reagent 2 is added 70 microliters and a constant temperature is carried out for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, absorbance 2 was measured at the point by the dominant wavelength of 340 nm, and 570 nm of complementary-wave length.

## 【0056】

The difference of absorbance 1 and absorbance 2 was calculated and the value of a test substance was converted by making control of known LDL-cholesterol concentration into a standard solution.

By the contrasting method, it found for LDL-cholesterol concentration by the Friedwald equation.

The HDL cholesterol value used PG pole by International Reagents Corp.

The total cholesterol value was calculated using T-CHO reagent\*A by International Reagents Corp.

TG value was calculated using TG reagent \*A by International Reagents Corp.

The comparison with the contrasting method was shown in Table 3 as a measurement result. this method became the result of the contrasting method, and the favorable result which was well in agreement.

## 【0057】

Manufacture of a reagent 1

Buffer  
pH7.0  
Potassium-sulfate Cinnamomum-camphora (6)  
arene 1.0 mmol/L  
Cholesterol dehydrogenase

コレステロール脱水素酵素	20	U/ml	
20 U/ml			(beta)- nicotinamide-adenine-dinucleotide
β-ニコチンアミドアデニ			oxidation type [NAD]
ンジヌクレオチド酸化型 [NA	5.0	mmol/L	
D]			Cholesterol oxidase
			10
			U/ml
			Cholesterol hydrolase
			1
			U/ml
5.0 mmol/L			
コレステロール酸化酵素			
10 U/ml			
コレステロール加水分解酵			
素	1	U/	
ml			

【0058】			[0058]
試薬2の調製			Manufacture of a reagent 2
緩衝液			Buffer
pH8.5			pH8.5
二塩化ヒドラジニウム			Dichloride hydrazinium
300 mmol/L			300
コレステロール加水分解酵			
素	3	U/	
ml			3
			U/ml

【0059】

[0059]

【表3】

[Table 3]

単位: mg/dl

検体	対照法	本 法
1	118	116
2	178	177
3	58	45
4	137	145
5	113	117
6	80	80
7	102	104
8	93	94
9	192	194
10	120	128

unit: mg/dL

Left to right: test substance, contrasting method, this method

【0060】

## 【実施例4】

VLDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1および試薬2を調製し、VLDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清5例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体5 $\mu$ lに試薬1を180 $\mu$ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0061】

さらに、試薬2を60 $\mu$ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のVLDL-コレステロール濃度の血清を標準液として検体の値を換算した。対照法として超遠心法を用いた。測定結果として対照法との比較を表4に示した。本法は、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0062】

試薬1の調製

緩	衝	液
pH8.0		
コレステロール脱水素酵素		
20	U/ml	

[0060]

## [Example 4]

The assay of the cholesterol in a VLDL fraction  
The following reagents 1 and reagents 2 are prepared, vLDL-cholesterol concentration was measured.

Five blood serums of the man in the street were used for the test substance.

The measurement was implemented with the Hitachi 7170 mold autoanalyzer.

First, the operating method adds a reagent 1 to test-substance 5 microliter 180 microliters, and it carries out a constant temperature for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, absorbance 1 was measured at the point by the dominant wavelength of 340 nm, and 570 nm of complementary-wave length.

[0061]

Furthermore, a reagent 2 is added 60 microliters and a constant temperature is carried out for 5 minutes at 37 degrees-Celsius, at this point, absorbance 2 was measured at the point by the dominant wavelength of 340 nm, and 570 nm of complementary-wave length.

The difference of absorbance 1 and absorbance 2 was calculated and the value of a test substance was converted by making the blood serum of known VLDL-cholesterol concentration into a standard solution.

The ultracentrifugal method was used as a contrasting method.

The comparison with the contrasting method was shown in Table 4 as a measurement result. this method became the result of the contrasting method, and the favorable result which was well in agreement.

[0062]

Manufacture of a reagent 1

Buffer	
pH8.0	
Cholesterol	dehydrogenase
20	U/ml
(beta)-	nicotinamide-adenine-dinucleotide

$\beta$ -ニコチンアミドアデニ  
 ンジヌクレオチド酸化型 [NAD]  
 D]  
 5.0 mmol/L  
 塩化ナトリウム  
 100 mmol/L  
 Sodium chloride  
 0.1 %  
 Cholesterol oxidase 10  
 コール酸ナトリウム  
 0.1 %  
 Cholesterol hydrolase 1  
 コレステロール酸化酵素  
 10 U/ml  
 コレステロール加水分解酵  
 素 1 U/  
 ml

**【0063】**  
 試薬2の調製  
 緩衝液  
 pH8.5  
 二塩化ヒドラジニウム  
 300 mmol/L  
 トリトン X-100  
 0.4 %  
 コレステロール加水分解酵  
 素 3 U/  
 ml

**[0063]**  
 Manufacture of a reagent 2  
 Buffer  
 pH8.5  
 Dichloride hydrazinium 300  
 mmol/L  
 Triton X-100  
 0.4 %  
 Cholesterol hydrolase 3  
 U/ml

**【0064】** **[0064]**

**【表4】** **[Table 4]**

単位: mg/dL

検体	対照法	本法
1	15.2	13.2
2	13.6	11.2
3	26.2	24.5
4	41.0	45.6
5	22.2	18.5

unit: mg/dL

Left to right: test substance, contrasting method, this method

【 0 0 6 5 】

**【発明の効果】**

本発明によれば、第一反応でコレステロール酸化酵素と反応させ、第二反応でコレステロール脱水素酵素と反応させることにより、目的とするリポ蛋白質画分以外の画分由来のコレステロールの影響を排除することが可能となる。

【 0 0 6 6 】

さらに本発明によれば、生体試料中のリポ蛋白質を凝集させることなく、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することができる。すなわち、測定用試薬に、カリクスアレン類やその誘導体、ポリアニオン、多糖類（シクロデキストリン類など）、水溶性ポリマー等を反応液中に含ませることにより、生体試料中のリポ蛋白質を凝集させることなく、且つ他のリポ蛋白質の影響を受けることなく、選択的に特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することが可能となる。

【 0 0 6 7 】

以上のことより、本発明の方法ならびに本発明の試薬キットを用いる方法では、遠心分画などの分離分画が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。

[0065]

**[EFFECT OF THE INVENTION]**

According to this invention, it is made to react with a cholesterol oxidase at the 1st reaction. By making it react with a cholesterol dehydrogenase at a 2nd reaction, the influence of the cholesterol derived from fractions other than the lipoprotein fraction made into the objective can be eliminated.

[0066]

The assay of the cholesterol in a specific lipoprotein fraction can be carried out without further aggregating the lipoprotein in a biological sample according to this invention. Namely, into the reagent for a measurement, without it aggregating the lipoprotein in a biological sample by including calix arenes, its derivative, a poly anion, polysaccharides, such as cyclodextrins, a water-soluble polymer, etc. in a reaction liquid, and the assay of the cholesterol in a selectively specific lipoprotein fraction can be carried out, without receiving the influence of another lipoprotein.

[0067]

By the method of this invention, and the method using the reagent kit of this invention, since the separation fraction of the centrifugation fraction etc. is unnecessary, operation is more simple than the above thing. The problem in a measurement error or an artificial factor can be decreased.

**【 0 0 6 8 】**

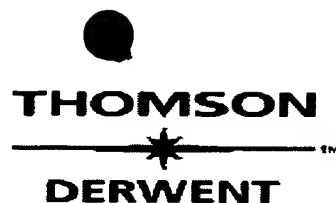
また、二種類の試薬を用いる方法に応用できるので、汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

**[0068]**

Moreover, it can apply to the method using a 2 types of reagent.

Therefore, the continuous measurement using the autoanalyzer of a general purpose mold is attained, it can multichannelize with another inspection item and can measure.

---



## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)